

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



CALOX DE COSTA RICA, S.A.

**IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE
POTENCIA MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS Y SU
IMPACTO ECONÓMICO EN LA EMPRESA
CALOX DE COSTA RICA, S.A.**

Proyecto para optar por el título de Ingeniería en Biotecnología
con el grado académico de Bachillerato Universitario

José David Mora Meza

Cartago Diciembre, 2007

RESUMEN

Los antibióticos son sustancias obtenidas a partir del metabolismo microbiano para matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos, constituyen un bien esencial para el ser humano en la prevención y cura de infecciones; por eso deben pasar una serie de análisis que certifiquen su calidad y eficacia. De manera que una de las pruebas más importantes para estos medicamentos es la determinación de potencia microbiológica. En este trabajo se pretende estandarizar la metodología para dicha prueba y analizar la factibilidad de implementación por parte de una industria farmacéutica, Calox de Costa Rica, S.A. Para esto, se utilizó el método Cilindro-Placa basado en la metodología de la U.S. Pharmacopeia (USP), este procedimiento se fundamenta en la formación de halos de inhibición de crecimiento bacteriano debido a la difusión de una solución de antibiótico en el agar que funciona como medio de cultivo para un organismo de prueba. En este caso se pretendió estudiar la actividad de gentamicina y neomicina en producto terminado y para este fin se usó la bacteria *Staphylococcus epidermidis*.

Como parte del procedimiento, un análisis estadístico comprobó la validez de los resultados y se determinó el porcentaje de potencia de la muestra mediante una comparación con un estándar de referencia de alta pureza. Para los productos con neomicina fue posible obtener resultados concluyentes que muestran que solo el Calox-Dry estuvo fuera de la especificación USP (80-125%). Para el producto con gentamicina no se logró la estandarización de la metodología dado la falta de resultados, pese a la incorporación de variables al procedimiento.

Finalmente se determinó que si bien la prueba no es complicada, técnicamente el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa no se encuentra en condiciones óptimas para sustituir los envíos a laboratorios externos, principalmente por la falta de equipo adecuado para el montaje y evaluación del ensayo. A pesar de esto, el aspecto económico es bastante favorable pues aunque en el trabajo no se considera en costo por mano de obra la inversión inicial para la implantación de la prueba es fácilmente recuperable en poco tiempo.

Palabras clave: Potencia Microbiológica, gentamicina, neomicina, antibióticos, *Staphylococcus epidermidis*.

**IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE
POTENCIA MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS Y SU
IMPACTO ECONÓMICO EN LA EMPRESA
CALOX DE COSTA RICA, S.A.**

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal

Ing. Olga Rivas Solano,
Profesora Asesora-ITCR

Dra. Maricela García Solano
Asesora-Empresa

MSc. Vladimir Villalba Velázquez
Lector

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su apoyo
incondicional y absoluto durante
mi preparación profesional.

José David

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Primero debo agradecer a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí y darme las fuerzas necesarias para cumplir mis metas y por la cantidad de buenas oportunidades que se me han presentado en la vida.

A la empresa por la oportunidad brindada y el apoyo financiero y logístico durante la realización del proyecto.

A la Dra. Maricela García por sus valiosos consejos y sugerencias y por haber compartido generosamente todos sus conocimientos. Además, por su aporte y la huella dejada tanto en mi vida profesional como personal debido a sus virtudes como ser humano.

A los diferentes miembros del Laboratorio de Control de Calidad, Irelis Álvarez, Paula Ramírez, Sandra Ruiz, Carlos Mora, Ariel Guzmán y Fabio Araya, pues de una u otra forma me brindaron su apoyo e hicieron más agradable la ejecución del trabajo.

A las personas encargadas del área de microbiología del Laboratorio de Análisis y Asesoría Farmacéutica de la Universidad de Costa Rica (LAYAFA) por la información y la asesoría técnica brindada.

A los miembros del tribunal evaluador por los valiosos aportes y sugerencias.

A mi familia que siguió de cerca este proceso y siempre me brindó su apoyo y comprensión, especialmente a Daniel por la gran cantidad de favores concedidos a lo largo de este tiempo.

Y a todos mis compañeros y amigos más cercanos que estuvieron pendientes en este último paso de mi carrera y me dieron aliento y muchas ganas de seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
III. OBJETIVOS	17
IV. METODOLOGÍA	18
V. RESULTADOS	29
VI. DISCUSIÓN	43
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. RECOMENDACIONES	55
IX. LITERATURA CITADA	57
X. ANEXOS	61

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación estructural de los principales 8 aminoglucósidos.	8
Cuadro 2. Productos y lotes que fueron analizados por la técnica 29 de potencia microbiológica en el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa CALOX en el periodo de julio a noviembre.	29
Cuadro 3. Promedios de la medición de halos de la dosis media 33 del estándar y de la muestra; y resultados finales del porcentaje de potencia de cada una de los lotes de Otosedán con neomicina.	33
Cuadro 4. Promedio de la medición de halos de la dosis media 34 del estándar y de la muestra; y resultado final del porcentaje de potencia de la muestra de Gastropectán con neomicina.	34
Cuadro 5. Promedio de la medición de halos de la dosis media 36 del estándar y de la muestra; y resultado final del porcentaje de potencia de la muestra de Calox-Dry con neomicina.	36
Cuadro 6. Comparación entre los resultados de potencia 38 microbiológica obtenidos para las muestras en el laboratorio de control de calidad de Calox y otros laboratorios de referencia.	38

Cuadro 7. Costo de los materiales y reactivos necesarios	40
para la preparación del análisis. Los valores se presentan en US\$ y se hace la equivalencia respectiva a colones según el tipo de cambio a la fecha (25/11/2007)	
Cuadro 8. Comparación de costos de la prueba de biopotencia	42
en tres laboratorios de referencia. Se considera el costo en dólares y su valor aproximado en colones a la fecha.	
Cuadro 9. Ponderación de los factores influyentes en la	50
factibilidad de implementación de la prueba de potencia microbiológica.	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química típica de los aminoglucósidos.	7
Figura 2. Base de aluminio sobre la que se llevó a cabo la prueba para eliminar fuentes de error por desnivel en la superficie de trabajo.	18
Figura 3. Esquema del diseño de análisis para la preparación de la curva estándar con las soluciones de antibiótico.	26
Figura 4. Esquema del diseño análisis para la preparación de las muestras.	26
Figura 5. Crecimiento de la cepa de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 después de haber sido rayada en una placa con Agar Tripticasa Soya.	29
Figura 6. Halos de inhibición del crecimiento correspondientes a la muestra de Otosedán del lote 22026 después de 18 horas de incubación a 37 °C.	30
Figura 7. Curva estándar obtenida para la prueba de Otosedán con neomicina, donde también se muestran los valores correspondientes a cada una de las muestras. M1: lote 22026 y M2: lote 44077.	31
Figura 8. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por las muestras de Otosedán analizadas. (A): M1, lote: 22026 y (B): M2, lote: 44077.	32

Figura 9. Halos de inhibición del crecimiento en las placas	32
de: (A): muestra 2 de Otosedán y (B): SE ₅ . Como se puede apreciar la placa derecha en A, así como las placas del centro y derecha en B no tienen definido ninguno de los halos.	
Figura 10. Curva estándar obtenida para la prueba de Gastropectán	33
con neomicina y punto donde se ubica las muestra con respecto a dicha curva.	
Figura 11. Halos de inhibición producidos en las placas que	34
corresponden a las soluciones de las muestra y la concentración media de estándar en el ensayo con Gastropectán (lote: 06047).	
Figura 12. Halos de inhibición producidos en las placas que	35
corresponden a las soluciones de la muestra y la concentración media de estándar en el ensayo con Calox-Dry (lote: 16116).	
Figura 13. Curva estándar obtenida para la prueba de Calox-Dry	36
con neomicina y punto donde se ubica la muestra con respecto a dicha curva.	
Figura 14. Placas correspondientes a la solución de la muestra y	37
del estándar medio en la prueba con Gentamicina aplicada a la Crema Cicatrizante Calox.	
Figura 16. Cilindros de acero inoxidable recomendados en la	45
metodología USP para llevar a cabo la prueba de Potencia Microbiológica de antibióticos.	

Figura 17. Cilindros que sustituyeron a los de la metodología 45
oficial de Potencia Microbiológica en el Laboratorio de
Control de Calidad de Calox de Costa Rica, S.A.

Figura 18. Colocador de manual de cilindros empleado en la técnica 46
de Biopotencia de antibióticos.

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Metodología Oficial USP	61
Anexo 2. Composición del Medio de Cultivo	67
Agar Nutritivo (Oxoid)	
Anexo 3. Composición del Medio de Cultivo	67
Agar Tripticasa Soya (Oxoid)	
Anexo 4. Detalle de los valores obtenidos en la	68
medición de los halos de inhibición en la prueba con Otosedán.	
Anexo 5. Detalle de los valores obtenidos en la	69
medición de los halos de inhibición en la prueba con Gatropectán.	
Anexo 6. Detalle de los valores obtenidos en la	70
medición de los halos de inhibición en la prueba con Calox-Dry.	

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son productos del metabolismo microbiano (bacterias y hongos) capaces de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos a bajas concentraciones. Entre los antibióticos generados por hongos solamente 10 se producen comercialmente. En las bacterias existen muchos grupos taxonómicos que producen antibióticos. La mayor variedad en estructura y número se encuentra en los actinomicetos, especialmente en el género *Streptomyces* (Mateos, 2006).

Durante la II Guerra Mundial la demanda de agentes quimioterapéuticos para tratar las infecciones de las heridas condujo al desarrollo de un proceso de producción para la penicilina y al inicio de la era de investigación sobre los antibióticos. En la actualidad continúa siendo una de las áreas más importantes de investigación dentro de la Microbiología Industrial (Mateos, 2006).

De la gran variedad de antibióticos reportados hasta el momento existen algunos que son de uso y comercialización muy frecuente, por lo que ocupan un lugar importante en los procesos de fabricación de la industria farmacéutica, no solo desde el punto de vista de obtención del metabolito, sino también de la incorporación de la materia prima en diferentes productos que se prescriben ante eventuales infecciones.

Los constantes avances de la medicina y la farmacología han generado la producción a nivel industrial de una gran cantidad de antibióticos que resultan de inmensa utilidad; sin embargo, es de trascendental importancia garantizar la efectividad de dichos medicamentos y verificar la actividad que presentan ante los microorganismos que se pretenden combatir, por eso, en la industria farmacéutica toda la manufactura debe ser estrictamente regulada y supervisada en diversos factores pues se trata de la generación de bienes que se dirigen a un consumo directo por parte de las personas o animales, así que se le debe garantizar a la población su efectividad e inocuidad (Mateos, 2006).

En la industria farmacéutica se requiere de una serie de pruebas que aseguren la calidad de los componentes de un determinado medicamento, como por ejemplo, los ensayos de estabilidad, que se definen como estudios cuyos resultados sustentan la proposición de aprobación, la comprobación y/o la modificación del periodo de validez o de las condiciones de almacenamiento rotuladas de un producto farmacéutico. Otra prueba importante es la determinación de la potencia o actividad, conceptualizada como el contenido de principio activo o fármaco presente en un producto farmacéutico o en una unidad de dosificación. Ambos parámetros son fundamentales para garantizar a la empresa productora y a los clientes el cumplimiento de ciertas especificaciones para mantener un alto nivel de efectividad y eficiencia en el producto (Leiva *et al*, 2001). De modo que, éstos se convierten en dos de los ensayos más importantes durante el control de calidad de los mismos, pues permiten conocer su rango de acción y las diferentes dosis necesarias, además de la duración y permanencia de éstas con respecto al tiempo y las condiciones de almacenamiento.

Pese a la importancia de la prueba para la determinación de potencia microbiológica de los antibióticos, en la industria CALOX DE COSTA RICA, este ensayo aún no se aplica como parte de las pruebas internas de rutina en el Laboratorio de Control de Calidad, y más bien, es necesario que los análisis sean realizados por laboratorios externos que brinden el servicio, pues el ensayo constituye una importante herramienta dentro del aseguramiento de la calidad de los productos debido al compromiso de la empresa con el bienestar en la salud pública.

Por lo anterior, resulta muy importante para la empresa, mediante este trabajo, estandarizar un protocolo e implementar dicha prueba, así como conocer el impacto económico de esta actividad, pues por tratarse de una organización privada no deben dejarse de lado los intereses económicos y la necesidad de que la implementación sea factible y conlleve beneficios adicionales (obtención rápida y oportuna de resultados, acceso a equipo e insumos) suficientes que justifiquen la inversión inicial y el gasto adicional de la prueba.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

Los alimentos, los medicamentos y las sustancias tóxicas constituyen los principales compuestos xenobióticos, es decir aquellos que son extraños al organismo humano. Dichos productos deben ser sometidos a una serie de controles que garanticen su calidad e inocuidad (Quevedo, 2004).

Los medicamentos son compuestos esenciales para el ser humano y sus organizaciones sociales. Se utilizan principalmente para diagnosticar, prevenir, curar o aliviar enfermedades; y en general para proteger y preservar la salud. A pesar de que han sido considerados como un "bien social" su uso no está exento de riesgos, entre ellos los relacionados con la dosificación, el incumplimiento de condiciones durante el diseño, procesamiento, almacenamiento, distribución, prescripción, dispensación y modalidades de conservación y uso por los pacientes. (Quevedo, 2004 y Jiménez y Estival, 1995).

Por lo anterior, para todos los medicamentos, especialmente los antibióticos, es indispensable garantizar su eficacia y calidad, pues de lo contrario se pone en riesgo la salud del paciente. En este sentido, se debe evaluar el comportamiento de estas sustancias tanto *in vitro* como *in vivo*, para así certificar la idoneidad de los productos empleados para las terapias (Méndez *et al*, 2005). Por eso, a pesar de que la industria farmacéutica es la que ha desarrollado una de las mayores experiencias en lo relacionado al aseguramiento y control de calidad, en la actualidad, dichas organizaciones necesitan establecer sistemas cada vez más eficientes para ser competitivas y de esta manera satisfacer las necesidades de los clientes y de la propia empresa, además de culminar con el proceso de comercialización de los productos (Camacho y Arias, 2002).

Como parte de los conceptos sobre calidad se encuentran las Buenas Prácticas de Manufactura-BPM ("Good Manufacturing Practices", "GMPs"). Cuando recién se presentaron, a nivel de la FDA de los Estados Unidos de América, fueron llamadas "Normas Paraguas" ("abrir el paraguas antes de que empiece a llover"). Estas normas se refieren al muestreo, especificaciones, y ensayo, así como a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita la circulación de los materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria (Camacho y Arias, 2002).

Otro concepto a considerar, cuando se aplican las BPM en la industria farmacéutica es el de la Validación de Procesos, definida por la OMS como el acto documentado para probar que los procedimientos, procesos, equipos, materiales, o sistemas aplicados producen efectivamente los resultados esperados. Las BPM también se encargan de prevenir las contaminaciones cruzadas, así como las confusiones que puedan producirse con algunos ingredientes o durante el etiquetado (Quevedo, 2004).

En la Industria Farmacéutica, los laboratorios de control de calidad junto con las BPM y los procesos de validación constituyen las "piedras angulares" del sistema de aseguramiento de la calidad, eficacia e inocuidad. Las pruebas analíticas físicoquímicas que los laboratorios emplean para demostrar la pureza, potencia, identidad, desempeño, estabilidad y otras características, son muy valiosas. Las técnicas microbiológicas para comprobar la ausencia de contaminaciones, con gérmenes de alteración o patógenos, en productos estériles o no estériles, deben reunir, al igual que las físicoquímicas, una serie de características para que sean confiables (Obregón y Zavaleta, 2000).

2.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS EN CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS

Para la valoración de antimicrobianos se tienen metodologías referenciadas por los organismos de control y vigilancia; algunas se evalúan con técnicas instrumentales, o bien, mediante bioensayos (Méndez *et al*, 2005). Estos últimos se refieren a ensayos que requieren seres vivos para la determinación de una característica de calidad en los medicamentos. Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, y se evalúan por las reacciones de los organismos de prueba (muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos) (Morales y Velazco, 1957).

Existen dos categorías de bioensayos: macrobiológicos, que hacen uso de animales de laboratorio intactos, preparaciones de origen animal, tejidos vivos aislados; y microbiológicos, que emplean seres unicelulares como hongos, bacterias, virus y levaduras. Mediante este tipo de pruebas es posible, por ejemplo, la determinación de potencia antimicrobiana de los antibióticos. La valoración de antibióticos empleando bioensayos con microorganismos permite hacer valoraciones individuales o comparativas de su actividad y relacionarla con la potencia y contenido del producto investigado (Méndez *et al*, 2005).

Cuando se desea implementar un bioensayo se debe tener en consideración una serie de factores como la selección del microorganismo, la concentración, el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, y otros que pueden influir en el resultado final (Méndez *et al*, 2005). Además la exactitud de estos análisis es diferente con respecto a los ensayos químicos. Una exactitud de ± 20 respecto al valor verdadero es muy buena y ± 10 es excelente en un bioensayo, debido a la alta variabilidad (Facultad de Farmacia, UCR, 2004).

Para minimizar las fuentes de error resultante de la variación animal durante los ensayos biológicos se utilizan estándares de referencia de medicamentos de alta pureza que se comparan contra la potencia de la preparación a prueba (Facultad de Farmacia, UCR, 2004).

2.3. AMINOGLUCÓSIDOS: GENTAMICINA Y NEOMICINA

De manera general, un antibiótico se define como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es la toxicidad selectiva, o sea, la toxicidad hacia los organismos invasores y su inocuidad frente a los animales o seres humanos (Jawetz *et al*, 1988).

Se afirma que la primera observación de lo que hoy en día se denominaría efecto antibiótico fue realizada en el siglo XIX por el químico francés Louis Pasteur, al descubrir que algunas bacterias saprofitas podían destruir gérmenes del carbunco (enfermedad también conocida como ántrax) (Mascaretti, 2003). Sin embargo, es importante mencionar que desde la antigüedad las sociedades se han dedicado a la utilización de diversos compuestos (extractos de plantas u hongos) para tratar algunas enfermedades, incluyendo las infecciosas (Martínez *et al*, 2000).

En un principio, el término antibiótico sólo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos que resultaban tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos o semisintéticos que se producen a nivel industrial (Ballesté *et al*, 2006).

Los antibióticos pueden atacar a los gérmenes a través de cualquiera de los siguientes mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared, desorganización de la membrana, inhibición de la síntesis protéica, interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos o por analogía con precursores metabólicos (Pérez *et al*, 1998).

En el recorrido hacia el lugar donde se localiza la infección, el antibiótico encuentra una serie de obstáculos, de manera que la concentración que finalmente se alcanza en el foco depende de su éxito en superarlos. Así, un antibiótico administrado por vía oral debe poseer suficiente estabilidad en el jugo gástrico, debe absorberse en proporción adecuada en el intestino, no debe ser metabolizado por el hígado en un primer paso, debe fijarse en escasa proporción a las proteínas plasmáticas y debe poseer, además, la necesaria solubilidad para difundir hacia los tejidos (Jawetz *et al*, 1988).

Es evidente que la prescripción de un antimicrobiano tiene como finalidad modificar la interacción agente infeccioso/hospedero en favor de este último. Por lo tanto, la correcta elección de un antimicrobiano debe contemplar simultáneamente las características del germen y las características del hospedero.

Tanto la gentamicina como la neomicina son antibióticos pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos (AMG), que pueden resultar indispensables para el tratamiento de algunas infecciones graves causadas por bacterias aerobias gram negativas (USP XXVII, 2004).

Como grupo se caracterizan por:

- Pobre absorción oral
- Actividad sobre aerobios gram (-)
- Oto y nefrotoxicidad
- Actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis*
- Efecto sinérgico con beta-lactámicos

La estructura química común de este tipo de antibióticos consiste en dos o más aminoazúcares unidos por un enlace glucosídico a una hexosa o a un aminociclitol, colocados en posición central en la mayoría de compuestos o en uno de los extremos,

como se observa en la figura 1. Son compuestos hidrosolubles y su actividad antibacteriana resulta inhibida en medio ácido, en anaerobiosis y en presencia de pus.

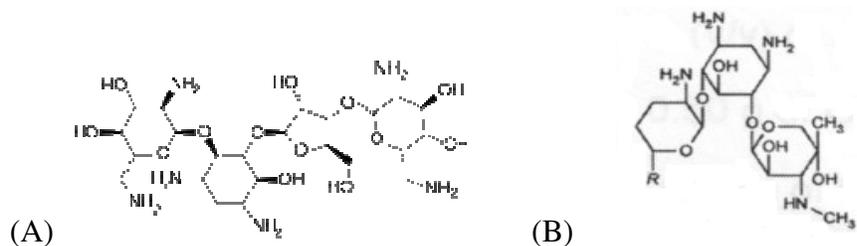


Figura 1. Estructura química típica de los aminoglucósidos. (A) Neomicina y (B) Gentamicina.

Los aminoglucósidos son activos frente a aerobios gram negativos como *Pseudomonas aureginosa*, *E. coli*, *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp* y *Citrobacter sp*. Son inactivos frente a todos los aerobios gram positivos con excepción de los estafilococos. Se utilizan en clínica en combinación con beta-lactámicos precisamente para potenciar su actividad antiestafilocócica. Por otra parte, todos los estreptococos son resistentes a los aminoglucósidos en concentraciones clínicas, pero la asociación con beta-lactámicos hace que se vuelvan sensibles. Los anaerobios estrictos y facultativos en condiciones de anaerobiosis son resistentes a los aminoglucósidos (Scraga, 2000).

Estos antibióticos no se metabolizan y su eliminación es fundamentalmente renal. Todos los aminoglucósidos pueden producir toxicidad vestibular, coclear y renal (Pérez *et al*, 1998).

El primer antibiótico de este grupo, la estreptomina, fue obtenido en 1944 de una cepa de *Streptomyces griseus* aislada del suelo. Unos años después, en 1949, fue aislada a partir de *Streptomyces fradiae* la neomicina, que sólo se utiliza en forma tópica dada su elevada oto y nefrotoxicidad. De manera que, la kanamicina descubierta por Umezawa en Japón en 1957 se convirtió en el aminoglucósido de elección hasta el descubrimiento de la gentamicina (Mascaretti, 2003).

La neomicina está compuesta de Neomicina A, B (la más usada) y C. Es hidrosoluble y más activa a pH alcalino (Camacho y Arias, 2002). Es uno de los antibióticos tópicos más utilizados, está presente en múltiples productos para el tratamiento de lesiones cutáneas, oftalmológicas y otorrinolaringológicas (Gerónimo *et al*, 2002).

Por otro lado, la gentamicina aislada en 1963 de una cepa de *Micromonospora purpurea* es eficaz contra numerosas bacterias gram negativas, incluyendo la *Pseudomonas aeruginosa*. Es un antibiótico empleado para tratar infecciones oculares, cutáneas, pulmonares, gástricas, urinarias y en sangre (Mascaretti, 2003).

En el siguiente cuadro se pueden observar otros ejemplos de este tipo de antibióticos clasificados según su estructura química en función de dos tipos de anillos aminociclitolos. El primer grupo está constituido por un anillo de estreptidina en posición lateral. Los grupos de las neomicinas, kanamicinas y gentamicinas están constituidos por un anillo central de 2-desoxiestreptamina.

Cuadro 1. Clasificación estructural de los principales aminoglucósidos.

A) GRUPO DE LA ESTREPTIDINA		
Estreptomincinas A y B		
Hidroxiestreptomincina		
Dihidroestreptomincina		
B) GRUPO DE LA DESOXIESTREPTAMINA		
B.1) Neomicinas	B.2) Kanamicinas	B.3) Gentamicinas
Grupo I	Kanamicinas A, B y C	Gentamicinas A, B y C
Robostamicina	Dibekacina	Sisomicina
Butirosinas A y B	Amikacina	Netilmicina
Grupo II	Butikacina	5-episisomicina
Neomicinas A, B y C	Habekacina	Isepamicina
Framicetina	Nebramicinas	Sagamicina
Aminosidina	Tobramicina	Verdamicina
Paromomicinas I y II		
Lividomicinas A y B		

Fuente: (Gerónimo *et al*, 2002)

El mecanismo de acción de este grupo de antibióticos ha sido ampliamente estudiado, sin embargo aún no se conoce en todos sus detalles. Todos los aminoglucósidos comparten el mismo mecanismo de acción secuencial, que incluye transporte al interior celular y unión a los ribosomas, donde tradicionalmente se ha considerado que ejercen su acción. Estos interactúan uniéndose de forma irreversible con algunas de las proteínas ribosómicas de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, así como con la molécula 16S de ARN-ribosómico. Las consecuencias de esta unión dependen del estado funcional del ribosoma. Si forma parte de un complejo de iniciación impiden que progrese a lo largo de la molécula de ARN mensajero y la síntesis proteica es bloqueada completamente. Si forma parte de un complejo de elongación causan errores en la lectura del ARN mensajero y se producen proteínas anómalas que hacen inviable la replicación bacteriana (Mascaretti, 2003).

Tradicionalmente se ha considerado que éste era el mecanismo de acción de este grupo de antimicrobianos, de hecho, se clasifican dentro de los antibióticos que actúan mediante inhibición de la síntesis proteica, junto con tetraciclinas, macrólidos, clindamicina y cloranfenicol. Sin embargo, la muerte celular inducida por aminoglucósidos ocurre más rápido de lo que cabría esperar si el único mecanismo de acción fuese la inhibición de la síntesis proteica, y por este mecanismo tampoco se explica que su acción sea bactericida (todos los anteriores antibióticos son bacteriostáticos) con las características descritas anteriormente, ni tampoco su sinergismo bactericida con antibióticos como los beta-lactámicos o glucopéptidos (Gerónimo *et al*, 2002).

Se sabe que las bacterias expuestas a la acción de los AMG presentan alteraciones de la pared celular, pero eso se interpretó como un epifenómeno en relación a la acción ribosomal. Sin embargo, hay evidencias de que el mecanismo de acción fundamental de los AMG es la lesión directa de la envoltura celular producida por el paso de las moléculas de AMG, y no el efecto ribosomal (Gerónimo *et al*, 2002).

Los AMG se unen por adsorción a los sitios de unión de cationes Mg^{2+} de los lipopolisacáridos de la superficie bacteriana. Esta unión de tipo iónico se produce muy rápidamente, es reversible, y puede ser inhibida por la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) en el medio. Posteriormente los AMG adsorbidos penetran hasta la membrana, en los organismos gram negativos a través de canales tipo porina de la membrana externa hacia el espacio periplásmico, y en los gram positivos, como en el caso de los estafilococos, a través de los espacios acuosos del peptidoglicano de la pared celular. Diversos estudios realizados sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aportan datos que sugieren que los AMG destruyen directamente la membrana externa de la envoltura celular de los gram negativos debido a que desplazan de su unión a los cationes necesarios para mantener la estabilidad de los constituyentes de dicha membrana. La desestabilización subsecuente se traduce en la formación de vesículas que, al desprenderse, ocasionan la pérdida de componentes de la membrana (proteínas, lipopolisacáridos, fosfatos), y en la formación de canales o agujeros, que permiten el libre paso de éstos u otros antibióticos hasta la membrana citoplasmática, así como la salida de componentes citoplasmáticos (Gerónimo *et al*, 2002).

Una vez que los AMG alcanzan el espacio periplásmico quedan unidos al exterior de la membrana celular de nuevo por adsorción. Una pequeña cantidad del fármaco adsorbido penetra al interior celular mediante un mecanismo de entrada denominado fase I dependiente de energía. Esta primera fase de captación ocurre en medio aerobio tanto en células sensibles como resistentes, y es un proceso lento, pero la intensidad con la que se produce es favorecida por elevadas concentraciones del AMG en el medio y por el gradiente de protones transmembrana, que favorece la electroforesis de las moléculas de AMG a través de los canales acuosos. Así pues, la concentración intracelular inicial del fármaco es escasa, por lo que se une preferentemente a los ribosomas de los complejos de elongación, que son mucho más numerosos que los que forman los complejos de iniciación. Hay complejos de elongación asociados a la membrana celular que producen proteínas para reparar y mantener indemne dicha

membrana. La acción intracelular inicial de los AMG es la síntesis anómala de proteínas, algunas de las cuales son incorporadas a la membrana celular, donde se crean canales proteicos que facilitan la entrada de más antibiótico, estableciéndose así un proceso autocatalítico de aumento de entrada, lectura anómala y formación de canales (Gerónimo *et al*, 2002).

Esta segunda fase de captación es denominada fase II dependiente de energía, sucede algunos minutos después de la primera fase sólo en células sensibles a los AMG, y su intensidad también es directamente proporcional a la concentración del AMG en el medio.

Según lo expuesto, la alteración de la membrana citoplasmática no sería debida a la acción directa de los AMG, sino como consecuencia de su efecto sobre los ribosomas; en cambio, la desintegración de la membrana externa sí sería consecuencia directa del paso de dichas moléculas. En la actualidad, mediante una técnica especial de microfotografía se han observado los efectos de la gentamicina sobre cepas vivas de *P. aeruginosa*. Se ha confirmado la formación de vesículas y de indentaciones, pero las microfotografías han mostrado que también ocurre elongación bacteriana (fenómeno del que no se tenía constancia) y que la envoltura celular se puede separar en bloque del cuerpo principal de la célula, con pérdida del contenido citoplasmático. Muy probablemente este mecanismo de acción, la desintegración de la membrana externa, sea el que más aporte a la muerte celular a través de la alteración del metabolismo y la respiración celulares por pérdida de sustancias citoplasmáticas (Gerónimo *et al*, 2002).

Por otra parte, la resistencia bacteriana a los AMG puede variar enormemente de un país a otro, de una institución sanitaria a otra e, incluso, de un servicio a otro dentro de un mismo hospital. La resistencia mediada por plásmidos unida a un uso excesivo puede explicar estas disparidades (Iturburo *et al*, 2000).

Dentro de los principales mecanismos de resistencia que presentan las cepas bacterianas ante los AMG se pueden mencionar (Gerónimo *et al*, 2002):

Resistencia permanente cromosómica basada en los ribosomas. Consiste en la aparición de mutaciones en los *loci* genéticos correspondientes a las proteínas ribosómicas a las que se une el AMG, y los cambios conformacionales subsiguientes hacen inviable la unión.

Resistencia permanente cromosómica por transporte inefectivo. Consiste en la reducción de la captación del AMG por parte del organismo, ya sea como resultado de cambios en el metabolismo energético (con alteración de los sistemas de transporte iónicos transmembrana y reducción del gradiente protónico) o por cambios en la estructura de la membrana externa del organismo. Este tipo es poco frecuente, aunque dicha frecuencia va en aumento, especialmente en cepas hospitalarias de *P. aeruginosa* y su importancia clínica radica en el hecho de que confiere resistencia cruzada entre todos los AMG.

Resistencia permanente extracromosómica. Consiste en la producción y liberación al medio de enzimas (N-acetiltransferasas, O-fosfotransferasas y O-nucleotidiltransferasas) que se unen a las moléculas del AMG e impiden su captación por los sistemas de transporte, de modo que se reduce el transporte y la acumulación intracelular del antibiótico. En este proceso el fármaco apenas sufre alteraciones en su estructura química como fosforilación, adenilación o acetilación. El resultado es una disminución importante de la actividad bactericida de los AMG, así como la abolición del sinergismo bactericida con los antibióticos que actúan sobre la envoltura celular. En este tipo de resistencia, la bacteria sigue siendo sensible al antibiótico y para su supervivencia depende de la inactivación de éste; por tanto el grado de resistencia bacteriano dependerá de la razón entre la velocidad de inactivación del fármaco por parte de las enzimas y la velocidad del transporte del mismo. De los mecanismos de resistencia permanente éste es el más importante en las cepas de origen hospitalario por ser el más frecuente, el que confiere mayor grado de resistencia, y porque la

información genética para la síntesis de estas enzimas, codificada en plásmidos, es transferible por conjugación, lo que posibilita su diseminación entre diferentes microorganismos.

Un concepto muy vinculante entre los AMG y la prueba de biopotencia es el efecto postantibiótico (EPA), término utilizado para definir el período de tiempo durante el que persiste la supresión de crecimiento bacteriano una vez que ha finalizado la exposición de la colonia al antibiótico. Ocurre virtualmente con todos los antibióticos, pero existen notables diferencias en cuanto a su duración. Los mecanismos por los que los AMG exhiben EPA no están bien definidos; podría representar el tiempo requerido tras la exposición al fármaco para la resíntesis de proteínas ribosómicas, o la acción de una cantidad residual de AMG que continúa inhibiendo la síntesis proteica entre dosis (Gerónimo *et al*, 2002).

Los AMG exhiben EPA de duración media-larga frente a organismos gram negativos y gram positivos, y se ha comprobado que su duración se prolonga cuando el AMG actúa en asociación con un beta-lactámico, y cuando en el medio existen tensiones de oxígeno aumentadas. Además, es mayor *in vivo* que *in vitro*, lo cual pudiera ser debido a la acción de los leucocitos, o bien a que la velocidad de crecimiento de los organismos en los cultivos es menor que en los modelos animales. Al igual que ocurre con el efecto bactericida, la concentración del AMG también afecta de forma proporcional la duración del EPA (Gerónimo *et al*, 2002).

2.4. POTENCIA MICROBIOLÓGICA DE GENTAMICINA Y NEOMICINA

La actividad o potencia de estos y cualquier otro antibiótico, puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio del crecimiento de un organismo sensible a la sustancia en cuestión (Gennaro, 2000). Una reducción en la actividad antimicrobiana puede revelar cambios sutiles que no son demostrados por métodos químicos (USP XXX, 2007).

En los análisis de potencia, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia (BP, 2007; Morales y Velazco, 1957). Si se prueban las muestras en diferentes concentraciones se puede determinar una concentración inhibitoria mínima del antibiótico hacia ese microorganismo (Ballesté, 2006).

Existen dos métodos que se emplean en este análisis, el de cilindro-placa o ensayo en placa y el turbidimétrico o ensayo en tubo. El primero depende de la difusión del antibiótico en el agar que funciona como medio de cultivo para el patógeno de prueba. Dicha difusión ocurre a partir de un cilindro impregnado del antibiótico, el cual es colocado sobre la superficie del agar, formando así una zona circular de inhibición de crecimiento del microorganismo alrededor del cilindro que contiene la solución de antibiótico. El método turbidimétrico depende de la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano en una solución uniforme del antibiótico en un medio líquido favorable para su rápido crecimiento en ausencia del antibiótico (USP XXX, 2007).

La evaluación y la interpretación de los resultados en esta técnica se realizan por la medición de los halos de inhibición del crecimiento del organismo de prueba o mediante las concentraciones capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias en el medio líquido para el método turbidimétrico (USP, 2007; Camacho y Arias, 2002). Así, con la aplicación de un adecuado análisis estadístico es posible determinar más allá de si un microorganismo es sensible o resistente a determinado antibiótico y junto con las pruebas de estabilidad de los mismos se logran determinar valores definidos que permitan un buen posicionamiento del producto en el mercado (Muñoz *et al*, 1999).

2.5. MICROORGANISMO DE PRUEBA: *Staphylococcus epidermidis*

El género *Staphylococcus*, perteneciente a la familia *Micrococcaceae* corresponde a microorganismos que están presentes en la mucosa y en la piel de los seres humanos y de otros mamíferos y aves. Comprende en la actualidad a 35 especies y 17 subespecies. Las especies que se asocian con más frecuencia a las enfermedades en seres humanos son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus haemolyticus* (Montiel, 1997).

Se caracterizan por ser cocos gram positivos de un diámetro entre 0,7 y 1,2 μm y que tienen tendencia a formar grupos dado que la división celular no conduce a la separación completa de las células hijas. No son formadoras de esporas y viven bien en los medios ordinarios, sobre todo sólidos (Jurado *et al*, 2002).

Parte de las características de sus factores de virulencia es que poseen en su estructura los ácidos teicoico y lipoteicoico y los péptidoglicanos. Los ácidos le sirven para adherirse a superficies corporales junto con las especies de estafilococo que tienen cápsula, y en conjunto los ácidos teicoicos y el péptidoglicano tienen la característica de activar el sistema inmune del complemento. Además sirven de evasores de la fagocitosis (Moreno y Ruiz, 2007).

Los estafilococos plasmocoagulasa-negativos (ECN) constituyen una parte esencial de la flora comensal cutánea y mucosa del ser humano. Son los clásicos oportunistas que sólo poseen un escaso potencial patógeno en las personas inmunocompetentes. El *Staphylococcus epidermidis* es responsable del 70 – 80 % de las infecciones por ECN. (Lode y Stahlmann, 2004). Este tipo de microorganismos también son gérmenes multirresistentes, y muchas veces requieren altas dosis de antibiótico por vía intravenosa; Cerca del 90% producen beta lactamasas, mientras que 60% al 80% son resistentes a la metilina (García *et al*, 2003 e Iturburo *et al*, 2000). Sin embargo, se ha determinado su sensibilidad ante los antibióticos que se pretenden probar en este

trabajo, neomicina y gentamicina. Y como se mencionó antes, los AMG, por lo general resultan efectivos contra los estafilococos y aún más en presencia de beta-lactámicos. Además *S. epidermidis* ha sido avalado y estandarizado como microorganismo de prueba para este análisis por las organizaciones encargadas de dictar las pautas para el control y aseguramiento de la calidad de los fármacos (Moreno y Ruiz, 2007; USP XXX, 2007).

S. epidermidis fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante. Es la causa más frecuente de infecciones en cuerpos extraños implantados (catéteres intravasculares, catéter de la diálisis peritoneal ambulatoria continuada (DPAC), derivaciones ventrículo-peritoneales, endoprótesis, prótesis valvulares cardíacas y prótesis articulares, marcapasos, etc.). Las cepas que provocan infecciones asociadas a cuerpos extraños, suelen proceder de la flora endógena del paciente. Sin embargo, también se producen infecciones nosocomiales exógenas (Jurado *et al*, 2002). En cuanto a la patogenicidad, se sabe que las cepas de *S. epidermidis* poseen la capacidad de adherirse a polímeros y de generar biopelículas que surgen de la multiplicación y formación de una capa mucosa (glucocálix) del patógeno. Este proceso se ve reforzado en presencia de proteínas de la matriz (por ejemplo: fibrinógeno, fibronectina) que cubren los cuerpos extraños en el organismo. Las biopelículas son focos infecciosos a partir de los cuales las bacterias entran en el torrente circulatorio y pueden causar una sepsis (Lode y Stahlmann, 2004).

I. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar en el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa CALOX DE COSTA RICA, S.A. la prueba para determinar la actividad *in vitro* (potencia) de los antibióticos gentamicina y neomicina sulfato en productos farmacéuticos terminados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer y estandarizar el protocolo para llevar a cabo la prueba de potencia o actividad de antibióticos basándose en la metodología USP (U. S. Pharmacopeia) y según los recursos con que cuenta la empresa.
- En el caso de neomicina indagar o probar la conveniencia de aplicar el método de cilindro-placa o turbidimétrico según sus requerimientos y los resultados obtenidos en cada caso.
- Determinar todos los requerimientos de reactivos y materiales para calcular el costo del ensayo y compararlo con el gasto actual por realización de la prueba en laboratorios externos.
- Establecer una relación costo-beneficio para la empresa al evaluar la factibilidad de que la prueba se realice como parte de las actividades de rutina del laboratorio de control de calidad.

IV. METODOLOGÍA

A partir de la metodología oficial de la USP XXX (anexo 1) se realizaron algunas modificaciones tratando de no alterar los resultados finales y de simplificar el procedimiento hasta donde fuera posible, de manera que se pudiera trabajar adecuadamente con los recursos con que se contó en el momento. Este ensayo se llevó a cabo en el área de Microbiología del Laboratorio de Control de Calidad de la empresa.

El procedimiento fue desarrollado con técnica aséptica en todo momento y se controló muy bien la temperatura especialmente, para el cultivo del microorganismo de prueba, para la preparación del inóculo y el periodo de incubación.

La mayoría de los pasos de dicho método se efectuaron en la cámara de flujo laminar que fue previamente asperjada con alcohol de 70° y 95°; además se utilizó dentro de ésta una base (mesa) de aluminio con la finalidad de nivelar la superficie de trabajo de la mejor manera posible y evitar la interferencia de dicho factor en los resultados (como se observa en la figura 2).

La manipulación durante el ensayo siempre se hizo utilizando guantes de látex estériles y rociados frecuentemente con alcohol.



Figura 2. Base de aluminio sobre la que se llevó a cabo la prueba para eliminar fuentes de error por desnivel en la superficie de trabajo.

4.1. MONTAJE DE LA PRUEBA

4.1.1. Preparación del microorganismo de prueba (*Staphylococcus epidermidis*)

- 4.1.1.1. Se reconstituyó la cepa de *S. epidermidis* (ATCC 12228) a partir de un tubo con la cepa liofilizada.
- 4.1.1.2. Se tomó un vial con la cepa reconstituida, se rayó en una placa Petri con Agar Nutritivo o Agar Tripticasa Soya y de igual forma en un tubo en cuña como control de crecimiento y para mantener el cultivo en refrigeración.
- 4.1.1.3. Se incubó durante 24 horas antes de la preparación del inóculo para el ensayo.

4.1.2. Preparación de Solución Salina Estéril al 0.9%

- 4.1.2.1. Se disolvió 0,9 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.
- 4.1.2.2. Se dispensó en tubos de ensayo colocando aproximadamente 10 ml por tubo.
- 4.1.2.3. Se autoclavó durante 15 min a 121 C°.

4.1.3. Preparación Solución buffer N° 3 estéril, 0.1 M, pH 8.0

- 4.1.3.1. Se pesaron 16.73 g de fosfato de potasio dibásico y 0.523 g de fosfato de potasio monobásico.
- 4.1.3.2. Se colocaron ambos reactivos en un balón aforado de 1000 ml. Se disolvieron en agua destilada y se llevó hasta la marca de aforo.

4.1.3.3. Se trasvasó la solución buffer a una botella y se ajustó el pH a 8.0 ± 0.1 , según se necesitó, con H_3PO_4 18 N o KOH 10 N antes de autoclavar.

4.1.3.4. Se esterilizó en autoclave a $121^\circ C$ por 15 minutos.

4.1.4. Preparación de Agar 11 para Antibiótico

Peptona.....	6.0 g
Caseína pancreática digerida.....	4.0 g
Extracto de levadura.....	3.0 g
Extracto de carne.....	1.5 g
Dextrosa.....	1.0 g
Agar.....	15.0 g
Agua.....	1000.0 ml

pH después de esterilización 8.3 ± 0.1

4.1.4.1. Se disolvieron 27 g (como lo indica el fabricante) de Medio N° 1 para Antibiótico (pH 6.5 ± 0.1) en 1000 ml de agua destilada.

4.1.4.2. Se ajustó el pH a 8.3 ± 0.1 con KOH 10 N antes de autoclavar.

4.1.4.3. Se esterilizó en autoclave a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

4.1.5. Preparación de Agar 11 para Antibiótico inoculado

4.1.5.1. Después de las 24 horas de incubación para el crecimiento del microorganismo de prueba, se tomó un tubo con solución salina al 0,9% estéril y se colocaron dos o más asadas del cultivo de *S. epidermidis*.

4.1.5.2. Se agitó en el Vortex para homogenizar completamente la suspensión.

4.1.5.3. Luego se determinó el porcentaje de transmitancia de la suspensión del microorganismo a una longitud de onda de 580 nm (utilizando solución salina como blanco).

4.1.5.4. Se ajustó dicho valor a un $25\pm 1\%$ de transmitancia concentrando o diluyendo la preparación según fuese necesario. Fue muy importante agitar constantemente para mantener la homogeneidad de la muestra.

4.1.5.5. Para la preparación del agar inoculado, se procedió de la siguiente manera:

4.1.5.5.1. En el caso de la prueba con gentamicina sulfato se agregaron 0.03 ml (30 μ l) de suspensión stock de *S. epidermidis* con 25% de transmitancia por cada 100 ml de Agar 11 para Antibiótico, el cual se encontraba a una temperatura de 45-50 °C en el momento de agregar la suspensión. Dicha mezcla se agitó vigorosamente para homogenizar el inóculo.

4.1.5.5.2. Para la prueba con neomicina sulfato, se siguió el mismo procedimiento aumentando la cantidad de suspensión stock a 0.4 ml (400 μ l) por cada 100 ml de Agar 11 para antibiótico.

4.1.6. Preparación de las placas de Petri

Se utilizaron placas Petri de vidrio con un diámetro de 100 mm y aproximadamente 20 mm de altura.

- 4.1.6.1. Inicialmente se colocaron en cada placa con una pipeta estéril 21 ml del Agar 11 para Antibiótico sin inocular y se dejó solidificar colocando las placas sobre la superficie nivelada.
- 4.1.6.2. Una vez solidificada la capa base de medio, se agregaron 4 ml de Agar 11 para Antibiótico inoculado con *S. epidermidis*.
- 4.1.6.3. Cuando esa segunda capa de agar solidificó, se colocaron sobre el medio y con la ayuda de una pinza estéril 6 cilindros de acero inoxidable por placa, los cuales tenían un diámetro interno de 6 mm y 5 mm de altura. Dichos cilindros se ubicaron aproximadamente a 1 cm del borde de la placa y lo más equidistantes posible.

4.1.7. Preparación de las soluciones estándar (SE)

4.1.7.1. PRUEBA CON NEOMICINA SULFATO:

- 4.1.7.1.1. Para preparar la solución madre, se pesó 0,05 g del patrón estándar de Neomicina Sulfato y se colocó en un balón aforado de 50 ml, se disolvió en solución buffer N° 3 estéril y se llevó hasta la marca de aforo con este diluyente para obtener una concentración final de 1 mg/ml.
- 4.1.7.1.2. Para preparar las soluciones estándar se realizaron las diluciones necesarias con buffer N° 3 estéril a partir de la solución madre para obtener las siguientes concentraciones:

- 1.0 µg/ml (SE₁): se tomaron 50 µl en balón de 50 ml.
- 1.5 µg/ml (SE₂): se tomaron 75 µl en balón de 50 ml.
- 2.0 µg/ml (SE₃): se tomaron 100 µl en balón de 50 ml.
- 2.5 µg/ml (SE₄): se tomaron 125 µl en balón de 50 ml.
- 3.0 µg/ml (SE₅): se tomaron 150 µl en balón de 50 ml.

4.1.7.2. PRUEBA CON GENTAMICINA SULFATO:

4.1.7.2.1. Para preparar la solución madre, se pesó 0,05 g del patrón estándar de Gentamicina Sulfato y se colocó en un balón aforado de 50 ml, se disolvió en solución buffer N° 3 estéril y se llevó hasta la marca de aforo con este diluyente para obtener una concentración final de 1 mg/ml.

4.1.7.2.2. Para preparar las soluciones estándar primero se diluyó la solución madre hasta 0,5 mg/ml, luego se realizaron las diluciones necesarias con buffer N° 3 estéril para obtener las siguientes concentraciones:

- 0.10 µg/ml (SE₁): se tomaron 10 µl en balón de 50 ml.
- 0.15 µg/ml (SE₂): se tomaron 15 µl en balón de 50 ml.
- 0.20 µg/ml (SE₃): se tomaron 20 µl en balón de 50 ml.
- 0.25 µg/ml (SE₄): se tomaron 25 µl en balón de 50 ml.
- 0.30 µg/ml (SE₅): se tomaron 30 µl en balón de 50 ml.

4.1.8. Preparación de la muestra (M)

Es importante tomar en cuenta que para realizar este paso se utilizó solamente una unidad de producto por cada una de las muestras.

4.1.8.1. **Crema cicatrizante Calox:** 0.10 g de Gentamicina sulfato por cada 100 g de vehículo.

4.1.8.1.1. Se pesó 1 g de crema que es equivalente a 1 mg de gentamicina sulfato.

4.1.8.1.2. Se colocó en un balón aforado de 100 ml y se agregó la mitad del volumen de buffer No.3 y se agitó vigorosamente durante 10 min para extraer el antibiótico.

4.1.8.1.3. Trascurrido este tiempo se llevó el volumen hasta la marca de aforo para tener una concentración final de 10 µg/ml.

4.1.8.1.4. A partir de la preparación anterior se realizó otra dilución de la muestra, tomando una alícuota de 1 ml en un balón de 50 ml y se llevó hasta la marca de aforo nuevamente con buffer No. 3. De esta manera se logró una concentración de 0,2 µg/ml, que corresponde a la dilución de prueba para la muestra.

4.1.8.2. **Otosedán con Neomicina (gotas óticas):** 0.500 g de Neomicina sulfato por cada 100 ml de vehículo.

4.1.8.2.1. Se tomaron 20 µl directamente de la muestra y se colocaron en un balón de 50 ml y se aforó con buffer fosfato No. 3. De esta manera se tuvo una concentración de 2 µg/ml, equivalente a la media de los estándares de antibiótico.

4.1.8.3. **Gastropectán con Neomicina (suspensión):** 1.25 g de Neomicina sulfato por cada 100 ml de vehículo.

4.1.8.3.1. Se agitó el producto para homogenizar y se tomó un volumen de 4.0 ml tratando de que estuviera libre de burbujas y se colocó en un balón de 50 ml para aforar con buffer No. 3. Esta solución intermedia tuvo una concentración de 1 mg/ml.

4.1.8.3.2. De la suspensión anterior se tomaron 100 µl en un balón de 50 ml y se aforó con el mismo buffer para lograr la concentración final de 2 µg/ml, que corresponde a la dosis media de prueba.

4.1.8.4. **Calox Dry:** 500 mg de neomicina en 10 ml de vehículo.

4.1.8.4.1. Se colocó en un balón de 50 ml el contenido de una jeringa de producto de 10 ml y se aforó con solución buffer No. 3.

4.1.8.4.2. Se agitó vigorosamente durante 5 minutos para poder extraer la totalidad del antibiótico. De esta forma se logró una solución con concentración de 10 mg/ml.

4.1.8.4.3. Se tomaron 10 µl de la solución anterior y se colocaron en un balón de 50 ml. Se aforó con el mismo buffer para una concentración final de 2 µg/ml.

4.1.9. Procedimiento para el ensayo por el método Cilindro-Placa

4.1.9.1. Para la curva de estandarización se utilizaron 3 placas Petri por cada solución estándar SE₁, SE₂, SE₄ y SE₅, lo cual equivale a un total de 12 placas preparadas.

4.1.9.2. En cada serie de tres placas se llenaron de forma alterna tres cilindros con la solución estándar respectiva SE₁, SE₂, SE₄ o SE₅ y tres cilindros con la solución estándar media SE₃, para obtener un total de 9 zonas de inhibición para cada solución

estándar SE₁, SE₂, SE₄ y SE₅ y 36 zonas de inhibición para la solución estándar media SE₃. (ver fig. 3). Durante la prueba las placas se identificaron muy bien con cada uno de los estándares según correspondía y además se señalaron los cilindros que contenían el estándar de concentración media para poder hacer la lectura adecuada de cada uno de los halos.

- 4.1.9.3. Para el ensayo con la muestra, se utilizaron igualmente 3 placas Petri preparadas por cada muestra.
- 4.1.9.4. En cada serie se llenaron alternamente tres cilindros con la muestra respectiva M y tres cilindros con la solución estándar media SE₃, para obtener así un total de 9 zonas de inhibición para cada muestra y 9 zonas de inhibición para la solución estándar media SE₃ (ver fig. 4).
- 4.1.9.5. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 36.0-37.5 °C. Después del tiempo de incubación se retiraron los cilindros del agar y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición utilizando una regla milimétrica y tomando en cuenta el promedio de tres mediciones para un mismo halo de inhibición. Es importante destacar que la USP recomienda estandarizar la prueba para la obtención de halos con diámetros entre 14 y 16 mm.

4.2. DISEÑO DE ANÁLISIS DE LA PRUEBA

A continuación se presentan las figuras 3 y 4 que resumen la forma en que se realizó la preparación de la curva estándar y de las muestras de producto. Como se explicó en el punto anterior cada placa contenía tres cilindros con la concentración media del antibiótico y tres con la concentración del estándar o la muestra respectivos. En este caso se representan con color rojo los puntos donde se colocaron cilindros con la

dosis media de antibiótico de referencia. El estándar 1 corresponde al color verde, el azul se asignó al estándar 2, el 4 se encuentra de color negro y el 5 está representado de café (figura 3).

Para las muestras, también los puntos rojos se refieren a la concentración media del antibiótico y suponiendo que se montaron tres muestras diferentes en un ensayo cada uno de los demás colores pertenece a las muestras analizadas (figura 4).

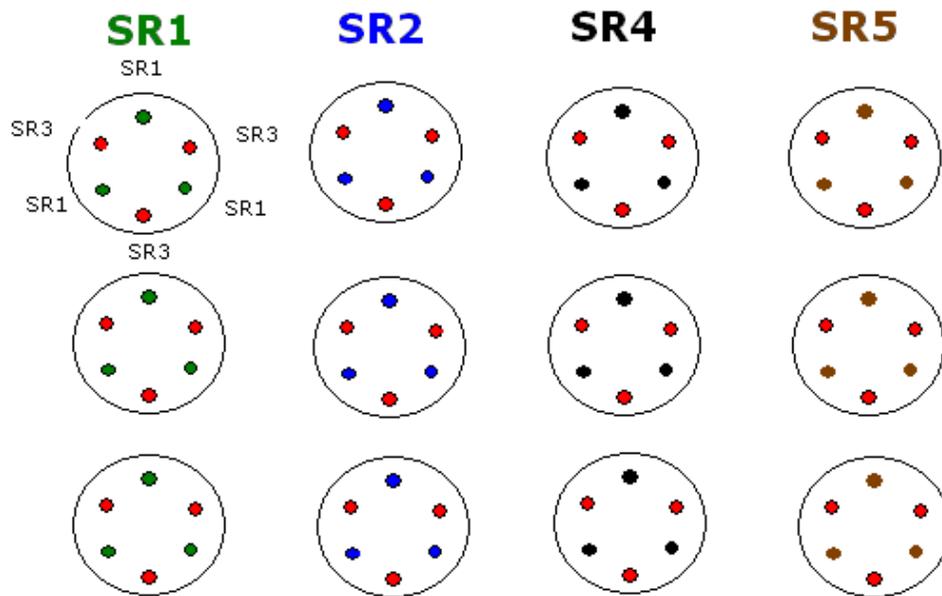


Figura 3. Esquema del diseño de análisis para la preparación de la curva estándar con las soluciones de antibiótico.

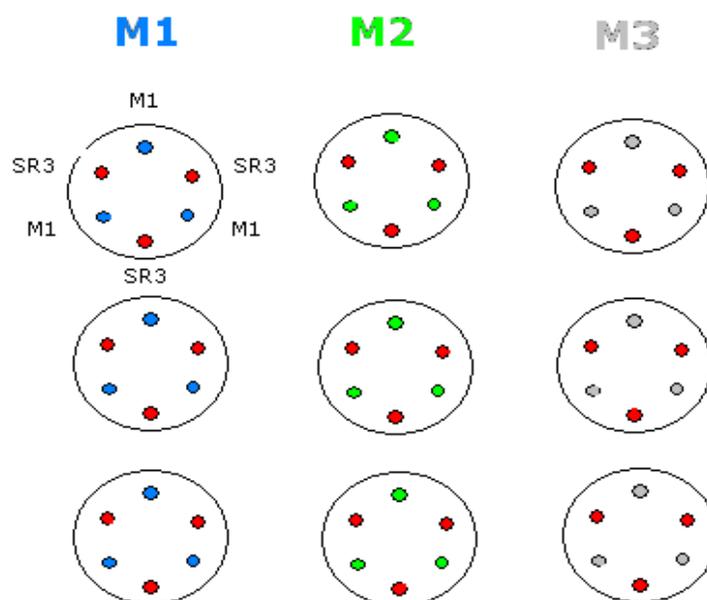


Figura 4. Esquema del diseño análisis para la preparación de las muestras.

4.3. CÁLCULO DE POTENCIA

Para calcular la potencia a partir de los datos obtenidos de la medición de halos se procedió a interpolar con la curva de estandarización. Con ayuda del programa Excel de Microsoft se trazó la curva usando los promedios de todas las mediciones y una transformación logarítmica de las concentraciones con respecto a la medición de los halos de inhibición. Además se aplicó el método de línea recta mediante el procedimiento de mínimos cuadrados y se hizo una prueba de linealidad para comprobar la relación entre las concentraciones y los valores obtenidos.

Finalmente el porcentaje o valor de las unidades internacionales de potencia se calculó haciendo una comparación por regla de tres con el patrón de referencia utilizado para el antibiótico, del cual sí se conoce con certeza la potencia.

4.4. ESTIMACIÓN DE LOS COSTOS DE IMPLEMENTACIÓN

Para determinar el costo de implementar la prueba de biopotencia en el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, se realizó un desglose del costo de los diferentes materiales y reactivos necesarios para el montaje del ensayo y se tabularon a manera de resumen para finalmente hacer la sumatoria del precio de todos los productos y establecer el monto de inversión inicial necesaria para implantar la prueba. Los datos de esta sección del trabajo fueron conseguidos mediante cotizaciones y con la ayuda del Departamento de Compras de la empresa.

4.5. FACTIBILIDAD DE IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA

Para evaluar la factibilidad de que los ensayos de potencia microbiológica se lleven a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la empresa Calox se procedió a elaborar un cuadro resumen con porcentajes ponderados que califican cada uno de los puntos clave y más influyentes dentro de esta prueba. Se asignó un valor específico (valor ideal) a cada aspecto y se establecieron diferentes parámetros (especificaciones) que justificaran el porcentaje otorgado (valor real), el cual se basó en todos los resultados obtenidos hasta el momento. Finalmente se realizó la sumatoria de los valores otorgados y se determinó así la conveniencia de su implementación para el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa.

V. RESULTADOS

Como parte del trabajo se realizó la prueba de potencia microbiológica a cuatro tipos diferentes de producto de los cuales tres contienen neomicina y uno presenta el antibiótico gentamicina en su formulación. Para uno de los productos se analizaron dos lotes diferentes y en los otros casos hubo un único lote ensayado. El cuadro siguiente muestra claramente los productos y lotes respectivos que se encontraron bajo análisis, así como el antibiótico que contienen.

Cuadro 2. Productos y lotes que fueron analizados por la técnica de potencia microbiológica en el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa CALOX en el periodo de julio a noviembre.

PRODUCTO	ANTIBIÓTICO	LOTE
Crema Cicatrizante	Gentamicina	32037
Otosedán*	Neomicina	22026 / 44077
Gastropectán	Neomicina	06047
Calox Dry	Neomicina	16116

*Producto de uso humano; los demás corresponden a uso veterinario.

Como primer paso de la prueba se tiene la obtención del crecimiento bacteriano de la cepa (figura 5) rayada en medio de cultivo Agar Nutritivo o Agar Tripticasa Soya (ver composición en anexos 2 y 3). A partir de éste se preparó la suspensión bacteriana para inocular el agar.



Figura 5. Crecimiento de la cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 después de haber sido rayada en una placa con Agar Tripticasa Soya.

Después de montar la prueba y del periodo de incubación fue posible observar en las placas un crecimiento bacteriano uniforme en la superficie del medio acompañado de la formación de halos de inhibición alrededor de cada uno de los cilindros que contenían una concentración determinada del antibiótico, tal y como se aprecia en la figura 6.

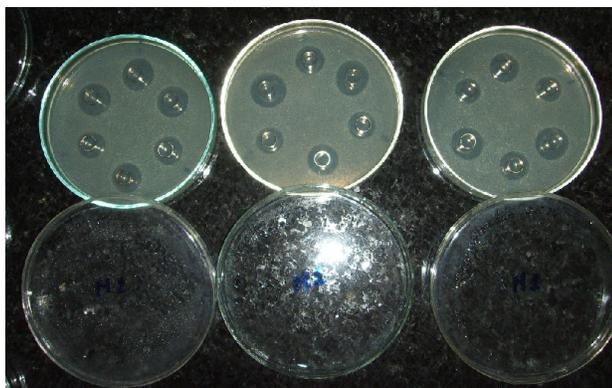


Figura 6. Halos de inhibición del crecimiento correspondientes a la muestra de Otsedán del lote 22026 después de 18 horas de incubación a 37 °C.

5.1. DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR Y PORCENTAJE DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA

5.1.1. Otosedán con Neomicina

Para este producto se analizaron dos lotes en un mismo ensayo, por lo que se preparó solo una curva con los estándares. A partir de la medición de las zonas de inhibición de crecimiento (que se pueden observar en la figura 8) se sacaron promedios, que junto con una transformación logarítmica de las concentraciones (ver anexo 4) permitieron trazar la curva de mejor ajuste usando el procedimiento de mínimos cuadrados (Figura 7). También se puede apreciar la ecuación de la recta obtenida y el coeficiente de determinación (r^2), el cual sirve como criterio de aceptación de la prueba pues estima la relación existente en los diferentes valores de “y” con respecto a los diferentes valores en “x”; de manera que, determina si las variaciones en el eje de las coordenadas se justifican con la variación en las abscisas. En este tipo de ensayos biológicos el rango de aceptación es de $r^2 \geq 0.98$. Por lo que las pruebas donde la curva estándar emita estos valores serán consideradas como válidas y se puede proseguir con el cálculo final de potencia microbiológica (Fernández *et al*, 2006).

En su conjunto los datos conseguidos con la medición de halos en la curva estándar constituyen una referencia sobre la viabilidad de la prueba en términos estadísticos y con esto se da un criterio de aceptación del análisis como válido o no.

Como se puede apreciar en la figura 7 los valores para ambas muestras se encuentran por encima de la curva en el mismo punto donde se ubica la concentración media del estándar (SE_3), lo cual significa que el promedio de la medida de sus halos de inhibición es mayor que la del patrón de antibiótico utilizado.

Por otra parte, una vez trazada la curva se determinó la ecuación de la misma y se realizó una prueba de linealidad que resulta fundamental para la aceptación de los datos.

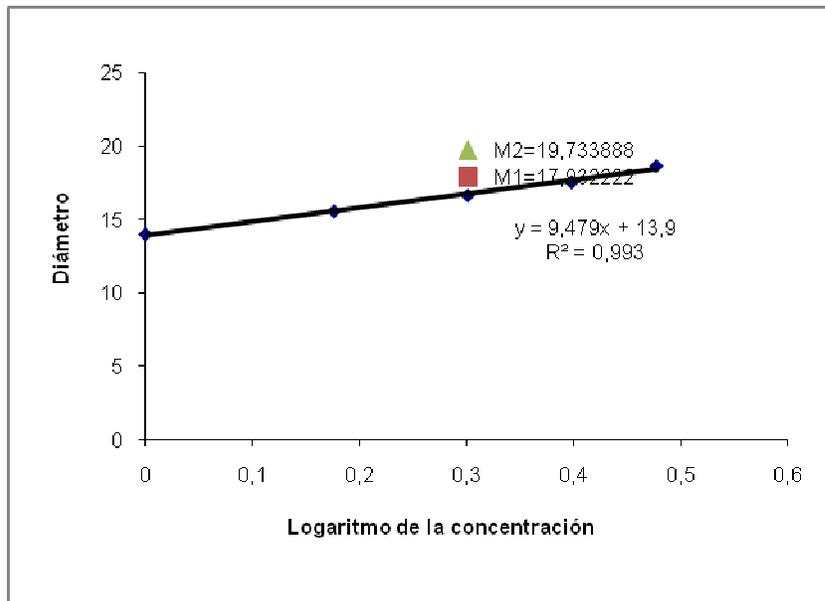


Figura 7. Curva estándar obtenida para la prueba de Otosedán con neomicina, donde también se muestran los valores correspondientes a cada una de las muestras. M1: lote 22026 y M2: lote 44077.

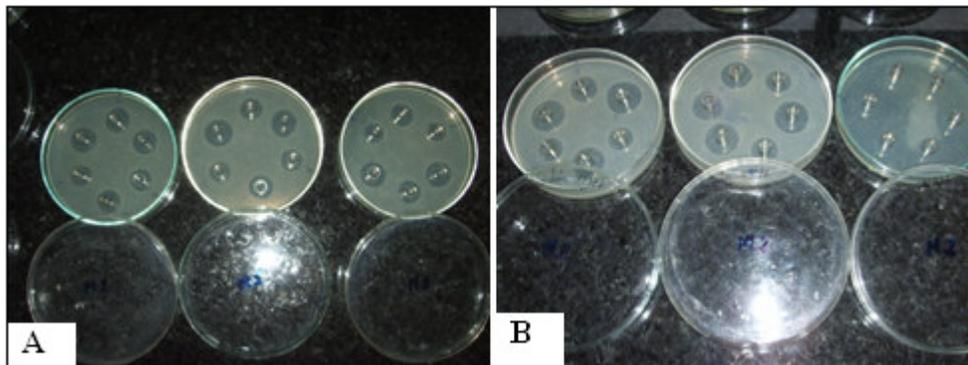


Figura 8. Halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por las muestras de Otosedán analizadas. (A): M1, lote: 22026 y (B): M2, lote: 44077.

Es importante señalar que en este primer ensayo tanto la serie de placas del SE₅ como de la muestra 2 (Otosedán, lote 44077) dieron problemas en cuanto a la formación de los halos (ver figura 6), pues al parecer el crecimiento bacteriano no fue tan uniforme en toda la superficie, de manera que, se realizaron únicamente las lecturas posibles.

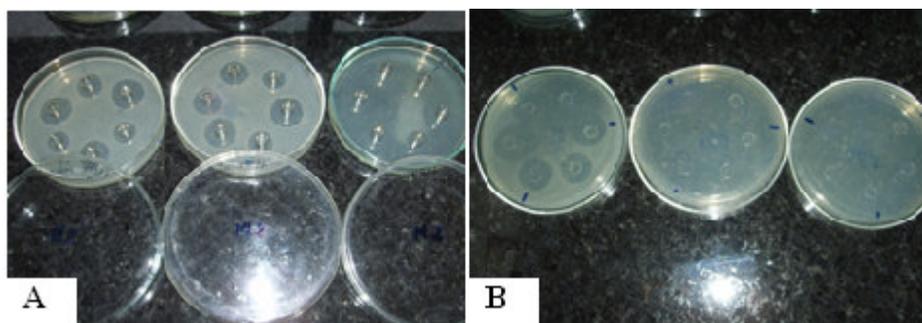


Figura 9. Halos de inhibición del crecimiento en las placas de: (A): muestra 2 de Otosedán y (B): SE₅. Como se puede apreciar la placa derecha en A, así como las placas del centro y derecha en B no tienen definido ninguno de los halos.

Como ya se mencionó el cálculo final de la potencia consistió en una comparación entre los valores obtenidos para el estándar de referencia y los de la muestra mediante una regla de tres. El cuadro 3 corresponde a los valores empleados en esta fórmula. En el caso de la dosis media del estándar se asume un 94% de potencia, ya que este es el porcentaje especificado en el certificado de análisis de dicho estándar.

Cuadro 3. Promedios de la medición de halos de la dosis media del estándar y de la muestra; y resultados finales del porcentaje de potencia de cada una de los lotes de Otosedán con neomicina.

MUESTRA (LOTE)	PROMEDIO SE₃ (mm)	% POTENCIA	PROMEDIO MUESTRA (mm)	% POTENCIA
M1: Otosedán L: 22026	16,6259	94	17,9322	101,3857
M2: Otosedán L: 44077	16,6259	94	19,0672	107,8028

5.1.2. Gastropectán con Neomicina

En este caso solo un lote de producto fue analizado. Al igual que con Otosedán se trazó la curva estándar, como se muestra en la figura 10 y se ubicó el punto correspondiente a los valores de la muestra. Además el promedio de los diámetros de las zonas de inhibición generadas por este producto (figura 11) también se encontró por encima de la concentración media del estándar.

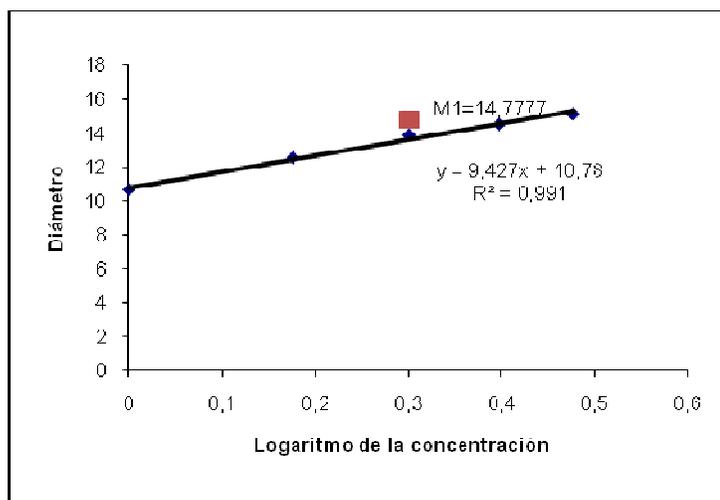


Figura 10. Curva estándar obtenida para la prueba de Gastropectán con neomicina y punto donde se ubica las muestra con respecto a dicha curva.

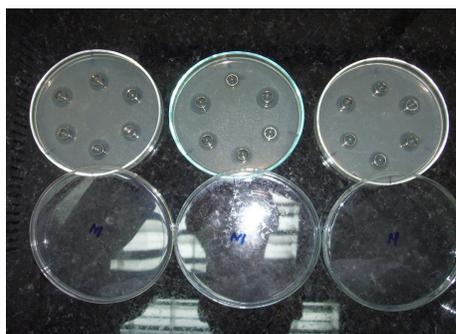


Figura 11. Halos de inhibición producidos en las placas que corresponden a las soluciones de la muestra y la concentración media de estándar en el ensayo con Gastropectán (lote: 06047)

En el cuadro siguiente se presenta el cálculo final del porcentaje de potencia de este producto. Cabe destacar que en este análisis se utilizó la misma solución madre del patrón de neomicina preparada para la prueba anterior. Esto porque, dicha solución puede mantenerse en refrigeración después de preparada hasta por 14 días. Sin embargo, sí existió una diferencia considerable en el promedio de los halos de inhibición de la concentración media entre estos dos ensayos.

Cuadro 4. Promedio de la medición de halos de la dosis media del estándar y de la muestra; y resultado final del porcentaje de potencia de la muestra de Gastropectán con neomicina.

MUESTRA (LOTE)	PROMEDIO SE₃ (mm)	% POTENCIA	PROMEDIO MUESTRA (mm)	% POTENCIA
Gastropectán L: 06047	13,8604	94	14,7778	100,2215

5.1.3. Calox-Dry con Neomicina

En este producto la muestra también consistió de un único lote y la preparación de una nueva curva estándar. Como se aprecia en la figura 12 hubo buen crecimiento bacteriano y formación de halos muy definidos y uniformes; sin embargo, la muestra produjo zonas de inhibición con diámetros bastante amplios con respecto a los que se habían obtenido hasta este momento. Es notable la diferencia con respecto a la dilución media del estándar que se encuentra en las mismas placas.

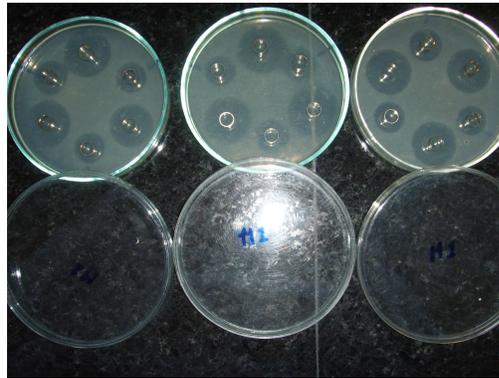


Figura 12. Halos de inhibición producidos en las placas que corresponden a las soluciones de la muestra y la concentración media de estándar en el ensayo con Calox-Dry (lote: 16116)

De las mediciones de dichos halos (ver anexo 6) deriva la curva estándar, que se presenta en la figura 13, así como los valores para la muestra con respecto a su homólogo SE₃. En este ensayo también ese valor se encuentra sobre la curva. Como en los casos anteriores se determinó la ecuación respectiva y se calculó el r^2 , los cuales aparecen en la parte posterior de la recta.

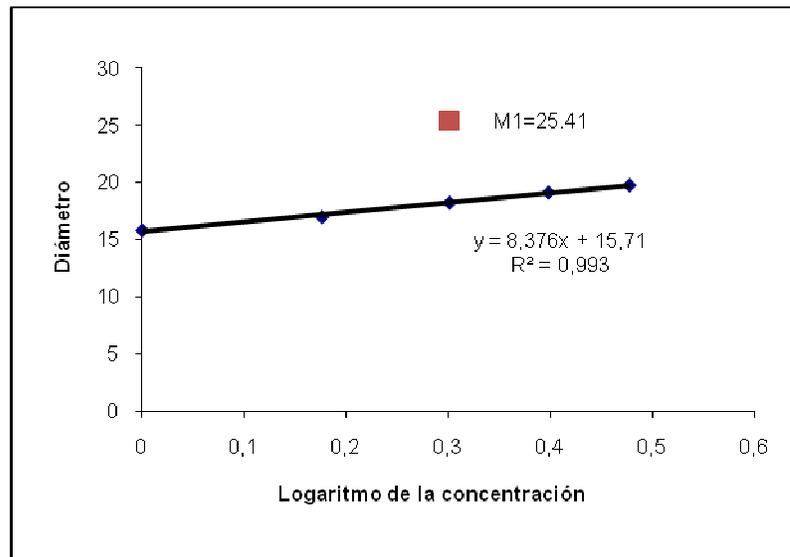


Figura 13. Curva estándar obtenida para la prueba de Calox-Dry con neomicina y punto donde se ubica la muestra con respecto a dicha curva.

Finalmente se calculó el porcentaje de potencia para la muestra (ver cuadro 5), tomando en cuenta que si el valor de potencia de SE₃ es 94%, entonces a cuanto corresponde el promedio de los diámetros del Calox-Dry.

Cuadro 5. Promedio de la medición de halos de la dosis media del estándar y de la muestra; y resultado final del porcentaje de potencia de la muestra de Calox-Dry con neomicina.

MUESTRA (LOTE)	PROMEDIO SE ₃ (mm)	% POTENCIA	PROMEDIO MUESTRA (mm)	% POTENCIA
Calox-Dry L: 16116	18,2211	94	25,4167	131,1210

5.1.4. Crema Cicatrizante con Gentamicina

En este producto se realizaron diferentes variaciones a la metodología debido a la dificultad para obtención de los resultados; sin embargo, de ninguna forma fue posible obtener halos de inhibición del crecimiento que permitieran su medición tanto en las placas con las soluciones del estándar como en las placas con la muestra. En la figura 14 se muestra una imagen que representa la falta de crecimiento bacteriano en las placas después de aproximadamente 18 h. de incubación.

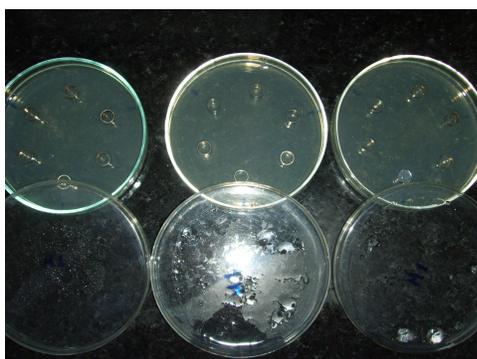


Figura 14. Placas correspondientes a la solución de la muestra y del estándar medio en la prueba con gentamicina aplicada a la Crema Cicatrizante Calox.

5.2. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE BIOPOTENCIA

Debido a que la prueba se trabajó con muestras de producto que ya habían sido aprobadas para su comercialización, se contaba con el resultado de análisis previos que fueron llevados a cabo por algunos laboratorios externos, de modo que, en el cuadro 6 se hace una comparación entre los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo y los resultados reportados por otros laboratorios para las mismas muestras.

Cuadro 6. Comparación entre los resultados de potencia microbiológica obtenidos para las muestras en el laboratorio de control de calidad de Calox y otros laboratorios de referencia.

PRODUCTO	LOTE	RESULTADOS					VARIACIÓN RESULTADOS ^a
		LAB. REFERENCIA	# REF.	FECHA ANÁLISIS	% POTENCIA	% POTENCIA CALOX	
Otosedán	22026	CCSS	-	08/03/06	101,2	101,3857	+0,19%
Otosedán	44077	MAG	9947	19/07/07	94	107,8028	+13,8%
Gastropectán	06047	MAG	1413	13/04/07	94	100,2215	+6,2%
Calox-Dry	16116	MAG	3138	22/11/06	117	131,1210	+14,1%
							X = 8,6%^b
Crema Cicatrizante	32037	MAG	2854	26/03/07	93	-	

^aValor correspondiente al % de potencia Calox menos el % de potencia del laboratorio de referencia.

^bPromedio de las variaciones entre los resultados de los diferentes productos.

Fuente: Laboratorio Control de Calidad, Calox de Costa Rica, S.A.

Como se puede apreciar en la última columna del cuadro anterior se estimó un valor que constituye la diferencia entre el porcentaje de potencia obtenido y el porcentaje de referencia reportado, dando así un promedio de variación de 8,6% con respecto al

valor teórico en el caso de neomicina. Para la gentamicina no fue posible determinar la discrepancia de resultados debido a la falta de datos para el laboratorio de Calox.

5.3. ESTIMACIÓN DEL COSTO DE IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA

El cuadro 7 muestra el desglose del costo de los diferentes materiales y reactivos necesarios para el montaje del ensayo. Para este fin los datos muestran una equivalencia aproximada entre el costo en dólares y en colones, según el tipo de cambio a la fecha (aprox. US\$1:¢516).

Cuadro 7. Costo de los materiales y reactivos necesarios para la preparación del análisis. Los valores se presentan en US\$ y se hace la equivalencia respectiva a colones según el tipo de cambio a la fecha (25/11/2007)

PRODUCTO	PRESENTACIÓN	PRECIO (US\$)	PRECIO (₡)
Cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	Tubo liofilizado	52.72	27 203.5
Cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	Tubo liofilizado	45.16	23 302.5
Placas Petri de vidrio	20 uds.	5.81	3 000.0
Medio Antibiótico N° 1	500 g	116.00	59 856.0
Hidróxido de Potasio	25 kg	23.06	11 900.0
Ácido Clorhídrico	2.5 L	60.47	31 200.0
Fosfato de Potasio dibásico	1 kg	31.49	16 250.0
Fosfato de Potasio monobásico	1 kg	45.00	23 220.0
Cloruro de Sodio	1 kg	0.53	273.0
Vernier	1 x (30 mm)	217.46	112 210.0
Base de aluminio nivelada	50 x 65 cm	492.25	254 000.0
Lupa	1	12.80	6 600.0
Penicilindros	132 uds.	806.03	415 911.0
Estándar de neomicina USP	200 mg	176.00	90 816.0
Estándar de gentamicina USP	200 mg	176.00	90 816.0
Flete + aduanas estándares	-	200.00	103 200.0
Inversión Inicial		2 460.78	1 269 758.0

Fuente: Departamento de Compras, Calox de Costa Rica, S.A.

Se debe tomar en cuenta que existen algunos materiales que constituyen únicamente una inversión inicial para la prueba, pues luego de su compra tendrán una vida útil

prolongada. Así por ejemplo, el gasto en los cilindros, la base nivelada, la lupa, vernier y placas Petri, que es un tanto elevado, resulta solo un desembolso al inicio de la implementación, puesto que posteriormente será posible utilizar estos materiales durante varios años.

Por otra parte, reactivos como el hidróxido de potasio o el ácido clorhídrico, que se emplean solo diluidos a bajas concentraciones para regular el pH del medio de cultivo; o el NaCl para preparar la solución salina al 0,9%, se utilizan en cantidades muy pequeñas, de manera que su aporte en el costo total de cada una de las pruebas sería mínimo. Mientras que el medio de cultivo y los estándares de antibiótico serían los materiales de mayor uso. Se espera que las cepas una vez reconstituidas puedan mantenerse viables durante un año.

El último costo evaluado en la tabla corresponde al gasto por transporte (flete interno en Miami, EEUU; flete aéreo a Costa Rica) y los gastos de aduana derivados de la importación de los estándares de antibiótico desde los Estados Unidos. Por esa razón, es preciso considerar dicho valor cada vez que se manden a comprar.

Según datos de producción del Departamento de Control de Calidad de Calox, para el año 2006 se generaron trece lotes diferentes de producto entre las cuatro muestras que se encuentran bajo estudio. Además se debe considerar que las pruebas de potencia microbiológica se llevan a cabo a lo largo del periodo en que un producto permanece en estabilidad, el cual corresponde a 5 años. En la empresa la planificación para pruebas de producto en estabilidad señala que son necesarios 10 análisis, uno al momento de la fabricación y posteriormente a los 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 y 60 meses. Por lo que, si se considera que cada lote de producto requiere de 5 ensayos solo durante el primer año, se estaría hablando de un total de 65 análisis. Y a lo largo de los 5 años en estabilidad serían necesarias 130 pruebas, sin considerar las que se van acumulando por ingreso de nuevos lotes o las pendientes de lotes anteriores.

A continuación se presenta el cuadro 8 que compara los costos de mandar a hacer el análisis a diferentes laboratorios que brindan este servicio.

Cuadro 8. Comparación de costos de la prueba de biopotencia en tres laboratorios de referencia. Se considera el costo en dólares y su valor aproximado en colones a la fecha.

LABORATORIO	COSTO / PRUEBA	
	US\$	¢
Caja Costarricense de Segura Social	74.00 ^a	38 185.00
Ministerio de Agricultura y Ganadería	58.00 ^b	29 928.00
LAYAFA (UCR)	80.00 ^b	41 280.00

^aDatos a agosto 2006

^bDatos a noviembre 2007

Fuente: Laboratorio Microbiología, Control de Calidad, Calox de C.R.

Como se evidencia el Laboratorio de Análisis de Medicamentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería es el que ofrece un menor costo para la prueba y de hecho es donde actualmente se envían todos los análisis de este tipo. Si se consideran solo los 65 ensayos que son necesarios durante el primer año de estabilidad de los trece lotes y un valor constante de US\$ 58 por prueba se puede determinar que al finalizar este periodo habrá un desembolso total de US\$ 3 770, que es una suma mucho mayor al total de la inversión inicial, de modo que, en poco más de siete meses es posible recuperar la inversión inicial hecha por la empresa para la implementación.

Es de suma importancia mencionar que el Departamento de Control de Calidad de la empresa debe considerar como una parte fundamental de los costos el recurso humano, ya que este aspecto se omitió dentro de la inversión inicial pues el costo será muy variable dependiendo del personal técnico que se dedique a dicha actividad, porque si bien no es tan complicado se emplea un procedimiento muy manual y el tiempo requerido dependerá del grado de entrenamiento, capacidad y habilidad.

VI. DISCUSIÓN

6.1. METODOLOGÍA UTILIZADA

Para la determinación de la potencia microbiológica de la neomicina y la gentamicina producidas en Calox de Costa Rica, se utilizó el método de Cilindro-Placa, empleando la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, ya que este tipo de bacterias presenta una conocida sensibilidad ante los AMG, los cuales, pese a ser inactivos contra aerobios gram positivos, presentan una respuesta efectiva frente al género *Staphylococcus* (Herrera *et al*, 2000).

En la preparación tanto de los estándares como de las muestras se utilizó el buffer fosfato No. 3 a un pH de 8.0, compuesto de fosfato de potasio dibásico y monobásico. La razón de emplear esta solución radicó en que ambos antibióticos resultaron más activos a pH alcalino que en medios ácidos, de manera que, esto permitió potenciar aún más su acción ante los microorganismos (Gerónimo *et al*, 2002). Además, también se utilizó un medio de cultivo con pH 8.3, tanto en la capa base como en la superficial, lo cual brindó mejores condiciones para la difusión del antibiótico a través del agar, y a pesar de que el crecimiento de *S. epidermidis* ocurre generalmente a pH cercano a la neutralidad, se obtuvo un buen crecimiento en el Medio Antibiótico 11.

Por otra parte, el crecimiento previo a la preparación del inóculo sí se llevó a cabo en un medio con pH 6.5, ya sea el Medio 1 que recomienda la USP o los Agares Nutritivo (AN) o Tripticasa Soya (ATS), que fueron los utilizados, pues se determinó que existía un adecuado crecimiento en estos medios, de forma rápida y las bacterias se mantenían viables luego de la preparación del inóculo; así que por comodidad y porque en el laboratorio siempre se encuentra preparado este tipo de medios para otros análisis de rutina, se optó por el uso de AN o ATS para el crecimiento bacteriano previo a la prueba de biopotencia, ya que de lo contrario, era necesario preparar constantemente cantidades muy pequeñas del medio 1 para antibiótico, lo

cual generaba un gasto mayor por los desperdicios y también el requerimiento de más tiempo de trabajo para su preparación.

Para la preparación de las placas necesarias se utilizó el medio antibiótico 11, sin embargo, éste se preparó a partir del medio 1 que había sido previamente adquirido en el laboratorio. Ambos poseen la misma composición, con la única diferencia de variación en el pH; por eso fue necesario ajustar el pH antes de autoclavar y no se hizo nuevamente posterior a la esterilización para disminuir riesgos de contaminación.

Cuando se dispensó el medio de cultivo en las placas y durante el resto de la preparación fue muy importante controlar la nivelación de la superficie de trabajo, ya que este factor podía influir considerablemente en la formación de los halos de inhibición del crecimiento, que se pretendía fueran lo más uniformes posible para no tener alteraciones en la medición de los diámetros*. Por esa razón, y como dicho proceso se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar se utilizó una base de aluminio con niveles (como se observó en la figura 2) que permitió controlar en todo momento este factor de variación dentro del ensayo.

Además en la prueba que se realizó no fue posible utilizar los cilindros de acero inoxidable (penicilindros) especificados en el procedimiento oficial (Figura 16); debido a que éstos tenían un costo muy elevado y resultó riesgosa la inversión en estos materiales, pues los resultados de la prueba eran inciertos y primero debía evaluarse la factibilidad de su implementación para decidir si era conveniente o no para la empresa. Por lo anterior, se sustituyeron con otros cilindros de un precio mucho menor, que se encontraron en una ferretería del área metropolitana (Figura 17). Estos instrumentos presentaron el mismo diámetro interno que los originales, pero con la desventaja de que su altura fue de solo 5 mm. Las dimensiones de los cilindros originales son: 6 mm de diámetro interno, 8 mm diámetro externo y 10 mm de altura (anexo 1). De modo que se dio una variación en el momento de llenar dichos cilindros con la solución de antibiótico, por eso, para contrarrestar ese efecto se

* Loría, 2007. Prueba Biopotencia. LAYAFA, UCR. (comunicación personal)

procedió a concentrar al doble las soluciones de antibiótico, con respecto a las concentraciones establecidas por la USP, con el fin de colocar solo la mitad del volumen (140 μ l) en cada uno de los cilindros.



Figura 16. Cilindros de acero inoxidable recomendados en la metodología USP para llevar a cabo la prueba de Potencia Microbiológica de antibióticos.



Figura 17. Cilindros que sustituyeron a los de la metodología oficial de Potencia Microbiológica en el Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica, S.A.

Aunque para la colocación de los cilindros la USP recomienda la utilización de un colocador de cilindros ya sea mecánico o manual, como el que se observa en la figura 18, en este caso no se utilizó y solamente se pusieron sobre el agar con la ayuda de

pinzas, pero sí fue importante colocarlos equidistantes y firmes para evitar que se pudieran traslapar las zonas de inhibición.



Figura 18. Colocador de cilindros manual empleado en la técnica de Biopotencia de antibióticos.

Además se debe mencionar que la metodología para la prueba con la Crema Cicatrizante Calox que contiene getamicina se vio variada en diversas ocasiones para tratar de lograr algún resultado satisfactorio.

En primera instancia, por un error durante la ejecución del procedimiento, luego de la estandarización del inóculo bacteriano a un 25% de tramitancia se agregó 0,3 ml por cada 100 ml de medio 11, cuando en realidad debía ser 0,03 ml según el procedimiento original. Los estándares y la muestra sí se mantuvieron con la concentración que se indica en la metodología. Esto intensificó el crecimiento microbiano e impidió la formación de halos de inhibición.

Después de este primer error se procedió a llevar a cabo el ensayo, tal y como se especifica en la metodología para la prueba con gentamicina. En esta oportunidad del todo no hubo crecimiento de la cepa sobre la placa con medio de cultivo y por consiguiente tampoco se observaron zonas de inhibición.

Como tercera prueba, basándose en los resultados anteriores, se pensó en colocar una cantidad media de inóculo entre las proporciones que ya se habían probado; por lo que se mantuvieron las concentraciones de las soluciones de antibiótico y se colocó 0,2 ml de solución bacteriana en 100 ml de Agar Antibiótico 11. Esto produjo como en la primera ocasión un crecimiento que no dio lugar a formación de halos de inhibición.

El último ensayo que el tiempo permitió realizar fue de igual forma que como se trabajó la prueba para neomicina. Con las mismas concentraciones en los estándares (1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 $\mu\text{g/ml}$) y en la muestra (2 $\mu\text{g/ml}$), y colocando 0,4 ml de suspensión microbiana para preparar el agar inoculado. Lo anterior provocó que no existiera ningún rastro de crecimiento bacteriano en las placas y por tanto no fue posible medir halos de inhibición. Tampoco se observó crecimiento en las placas que se incubaron como control de medio, que solo contenían el medio inoculado sin ninguna de las soluciones de antibiótico.

6.2. DESVENTAJAS DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Si bien la USP supone como válida la aplicación tanto del método Cilindro-Placa como del Turbidimétrico para las pruebas con neomicina, en este trabajo no se llevó a cabo la metodología que se basa en la turbidez.

Desde el comienzo del ensayo, con la búsqueda exhaustiva de literatura relacionada, llamó la atención la poca información sobre éste método. Para dar una respuesta a esta situación, a la vez que se justifica la no utilización del procedimiento, se trató de buscar las principales desventajas o factores que hacen poco conveniente el método.

A partir del criterio formulado como parte del trabajo y mediante la consulta a otras personas conocedoras de la materia, se pudo determinar que el ensayo en tubo para biopotencia es sencillo, en cuanto a técnica, pero requiere de un largo proceso de

estandarización, pues los resultados pueden ser aún más variables que en el método Cilindro-Placa[†]. En el primer caso el inóculo de microorganismos y la solución de antibiótico son colocados en tubos de ensayo con medio líquido, esto requiere que las condiciones de incubación sean muy estables y uniformes. Además las variaciones en las lecturas son más notables, en primer lugar, porque se mide por espectrofotometría y en segundo lugar, porque el crecimiento bacteriano en medio líquido es más variable debido a que existe una mayor capacidad de crecimiento que en placas, cuando las bacterias se encuentran introducidas en el agar y tienen poca movilidad, así que en el momento de lectura los resultados pueden ser variables y poco constantes; contrario a la metodología en placa, que tiene un periodo de incubación más largo que hace menos influyentes las condiciones ambientales y los sutiles cambios en éstas[‡]. Además por las limitaciones de tiempo y la falta de información sobre este procedimiento se prefirió tratar de estandarizar solo el método Cilindro-Placa, a fin de hacerlo de una manera conveniente y confiable y no intentar con ambas pruebas y que los resultados finales fueran inciertos.

6.3. COMPARACIÓN DE POTENCIAS ENTRE ESTÁNDARES Y MUESTRAS

Como se pudo observar en la sección de resultados el primer criterio de aceptación para la prueba consistió en elaborar una curva estándar de cinco puntos a partir de cinco diluciones de prueba. Luego se determinó la ecuación de la recta y se calculó un índice de correlación. Este análisis estadístico permitió determinar la concordancia de resultados entre “x” y “y” para comprobar que los resultados fueron confiables, que no se dieron al azar y que existió una relación entre los valores de ambos ejes. En todos los casos este valor estuvo por encima del límite que es $r < 0,98$. Una vez evaluado este factor se calculó el porcentaje de potencia de cada una de las muestras. Todas dieron un valor mayor al estándar de antibiótico utilizado y al resultado emitido por lo diferentes laboratorios de referencia.

[†] Morera, 2007. Prueba Biopotencia. LAYAFA, UCR (comunicación personal)

[‡] García, 2007. Método Turbidimétrico. Calox de C.R. (comunicación personal)

Por otra parte, la USP recomienda estandarizar la metodología para que se obtengan halos de inhibición con diámetros de 14-16 mm; sin embargo en este caso no todos los halos presentaron estas medidas, aunque sí la mayoría y principalmente los generados por los estándares medios (SE_3), por lo que con estos valores se realizaron los cálculos respectivos.

La diferencia en los resultados obtenidos no se explica muy fácilmente pues esta es una prueba que tiene gran cantidad de variables y posibles fuentes de error, por eso, es difícil determinar definitivamente cual de los factores fue el más influyente en este caso. Precisamente por lo anterior la USP establece un rango de aceptación muy amplio para los resultados, éste va desde el 80% al 125%. De modo que, de las muestras evaluadas tres de cuatro están cumpliendo con la potencia microbiológica de antibiótico distada por la USP como aceptable para los medicamentos que requieran el análisis. El único producto que estuvo fuera de especificación fue el Calox-Dry con neomicina, el cual presentó un 131,12% de potencia. Además es importante resaltar que actualmente los laboratorios que aplican la prueba no manejan una incertidumbre establecida, pues esto requiere de cálculos estadísticos que se complicarían por las variables de la prueba y la gran cantidad de instrumentos de medición utilizados, a menos de que se logre automatizar el procedimiento para hacerlo más preciso.

Aunque la metodología pudo probarse en varias ocasiones, por cuestiones de tiempo y disponibilidad de producto en el momento del análisis solo se utilizó en cinco lotes de producto distribuidos en cuatro diferentes productos. Por eso, aunque se estandarizó la metodología para la prueba con neomicina utilizando los recursos de la empresa, no se pudo validar el proceso pues de acuerdo a las normas farmacéuticas esto requiere de analizar al menos tres lotes de un mismo producto. Además por limitaciones de tiempo, no se repitió la prueba en cada uno de los productos para comprobar los resultados y poder determinar más acertadamente las variaciones y correcciones posteriores.

Por otro lado, la prueba con gentamicina no permitió obtener resultados concluyentes y aún no ha sido posible determinar la verdadera causa de las variaciones obtenidas. Preliminarmente se podría pensar en problemas con el crecimiento de la cepa bacteriana, la cual podría ser muy sensible a las concentraciones que especifica la USP. Sin embargo, no conviene apresurarse en dar este tipo de afirmaciones y más bien se debe insistir en la necesidad de más análisis, lo cual no fue posible dentro de este trabajo por cuestiones de tiempo.

6.4. FACTIBILIDAD DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA

A continuación se presenta un cuadro que pondera los principales aspectos a considerar en cuanto a la conveniencia de aplicar las pruebas de potencia microbiológica como parte de los análisis de rutina del Laboratorio de Microbiología de Calox de Costa Rica. En éste se asignó un porcentaje equivalente a cada uno de los factores como valor ideal y el valor real se estipuló tomando en cuenta la situación del laboratorio con respecto a la prueba.

Cuadro 9. Ponderación de los factores influyentes en la factibilidad de implementación de la prueba de potencia microbiológica.

FACTOR	VALOR IDEAL	ESPECIFICACIÓN	VALOR REAL
Tiempo total empleado en realizar la prueba	16,66%	< 4 h = 16.66% 4-6h = 12% 6-8 h = 8 % > 8 h = 4 %	8%
Estandarización (discrepancia de resultados con laboratorios de referencia)	16,66%	0% = 16.66% 1-4% = 12% 5-10% = 8% 10-20% = 4%	8%
Obtención oportuna de insumos	16,66%	< 1 mes = 16.66% 1-2 meses = 12% 2-3 meses = 8 % > 4 meses = 4 %	8%
Equipamiento del laboratorio	16,66%	Todo equipo complementario = 16.66% -1 equipo = 13% -2 equipos = 10% -3 equipos = 8%	8%
Recuperación de la Inversión inicial	16,66%	< 9 meses = 16.66% 9-12 meses = 12% 12-15 meses = 8 % > 15 meses = 4 %	16,66%
Tiempo para obtención de resultados	16,66%	< 3 días = 16.66% 3-5 días = 12% 5-7 días = 8 % > 7 días = 4 %	16,66%
TOTAL	100%		65,32%

Fuente: El autor

En cuanto al tiempo empleado para realizar la prueba, se encuentra entre 6 y 8 horas: dos horas para la preparación de todos los instrumentos, esterilizarlos y preparar los medios de cultivo, una para la preparación de la curva de estándares, dos para la preparación de las placas, incluyendo chorrear el medio, preparación del inóculo, colocación de cilindros y agregar las soluciones con antibiótico. Finalmente la

medición de halos de inhibición, como se realiza por triplicado para cada una de las zonas y tomando en cuenta que también hay tres placas por cada estándar y por cada muestra, tarda alrededor de dos horas. Adicional a esto se dedica un corto tiempo para tabular los datos y obtener los resultados finales mediante una hoja de cálculo de MS Excel previamente establecida.

Tomando en cuenta los resultados que se encuentran en el cuadro 6 se tiene un promedio de discrepancia entre los resultados de Calox y los reportados por laboratorios de referencia de 8,6%; por lo que, de acuerdo a la ponderación se debe otorgar un 8% en la evaluación de este aspecto.

En este primer paso de implementación de la prueba la obtención de todos los insumos fue un poco lenta, principalmente para los materiales que debían ser importados como las cepas ATCC, que tardaron poco más de dos meses para ingresar al laboratorio. Por otro lado, aunque en este caso no se adquirieron los cilindros de acero inoxidable, pero de acuerdo a las cotizaciones se sabe que su adquisición demanda aproximadamente 6 a 8 semanas. Así que considerando básicamente estos dos elementos se tendría un tiempo estimado de obtención de insumos de entre dos y tres meses.

El equipamiento del laboratorio hace referencia a la capacidad del mismo en cuanto a los equipos necesarios para realizar la prueba. Se considera que para llevar a cabo el análisis es indispensable contar con los equipos de rutina y equipos complementarios que son específicos para el ensayo. En esta última categoría se ubican los cilindros, la base nivelada, el vernier y el colocador de cilindros. En este caso, se asignó un valor de 8% pues aún no se cuenta con los penicilindros y no hay un instrumento de medición bien preciso, como un vernier o un lector de halos. Dado la importancia de estos instrumentos no fue posible otorgar un porcentaje alto, pues aunque se haya podido desarrollar la prueba con algunos sustitutos, lo más conveniente sería contar con ellos para disminuir las variaciones en los resultados y reducir fuentes de error.

Considerar el factor económico al implementar una nueva prueba en un laboratorio es imprescindible, por eso, como parte de la factibilidad se evaluó el tiempo en el que es posible recuperar la inversión inicial de acuerdo al gasto que se generaría por realización de la prueba en laboratorios externos. Este punto fue bastante favorable pues, pese a que no se consideró el gasto en personal capacitado, la recuperación del gasto de implementación se daría en aproximadamente 8 meses.

En cuanto al último aspecto ponderado, que fue el tiempo para la obtención de resultados, se obtuvo que al enviar dichos análisis a otros laboratorios los trámites retrasan el reporte de los resultados, por lo que la implementación de esta prueba beneficiaría a la empresa. Tomando como referencia el laboratorio del MAG se sabe que el tiempo de respuesta es de aproximadamente 10 días; mientras que con el desarrollo del ensayo en el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, las lecturas se realizarían después de 16-18 horas de incubación y en ese mismo momento se podrían tabular los datos y tener resultados finales. El periodo se reducía entonces a dos o tres días, permitiendo de esta forma una respuesta ágil y conveniente por parte de las autoridades encargadas de la calidad de los productos.

La sumatoria de los factores evaluados logró totalizar un 65,32% de aptitud o conveniencia para implementar y desarrollar la prueba como análisis de rutina en el Laboratorio de Microbiología de Calox de Costa Rica. Sin embargo se considera como óptimo un valor de, al menos, 90%, siempre y cuando, no haya que castigar en más de la mitad del valor a los rubros del equipo y la estandarización de los resultados ya que son factores críticos.

VII. CONCLUSIONES

- En este estudio todos los ensayos realizados a productos con neomicina dentro de su composición presentaron en los datos obtenidos de la curva estándar un porcentaje de correlación superior a 98 de modo que la prueba puede aceptarse como válida y proceder a la determinación del porcentaje de potencia microbiológica.
- Según las especificaciones de la USP de permitir valores de potencia entre el 80 y 125%, las muestras de Otosedán y Gastropectán están dentro del rango, mientras que la preparación de Calox-Dry estuvo por encima de los límites de aceptación.
- En todas las pruebas realizadas los valores de potencia obtenidos estuvieron por encima de los reportados por algunos laboratorios de referencia, generando así una discrepancia promedio de los resultados de 8,6%.
- Tomando en cuenta todos los materiales, equipo y reactivos necesarios para implementar la prueba dentro del Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica, se determinó una inversión inicial de aprox. US\$ 2461.
- En promedio anual se producen 13 lotes de producto con neomicina o gentamicina y dichos medicamentos deben pasar un periodo de 5 años en cámaras de estabilidad, con variaciones en las condiciones de almacenamiento para observar su comportamiento. Durante este tiempo también es indispensable llevar a cabo 10 pruebas de biopotencia a cada uno de los lotes, de modo que, por la cantidad de análisis y el costo de pagarlos en Laboratorios externo sería posible recuperar la inversión inicial en menos de 8 meses.
- Según la ponderación de los principales factores influyentes en la factibilidad de implementación de la prueba se puede concluir que el laboratorio cuenta con un 69,32% de aptitud o conveniencia para llevar a cabo el análisis como parte de los trabajos de rutina de dicha área.

- Basado en los resultados totales de la investigación se concluye que la implementación de la prueba de Potencia Microbiológica es factible para el Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica desde el punto de vista económico, pero en aspectos técnicos no se cuenta con las condiciones adecuadas para sustituir los envíos a laboratorios externos, principalmente por la falta del equipo adecuado (cilindros, colocador de cilindros, vernier o medidor de halos) y porque hace falta más tiempo de investigación para llegar a estandarizar la prueba.

VIII. RECOMENDACIONES

En primer lugar es muy importante que se logre equipar adecuadamente el Laboratorio de Microbiología, al menos, con los penicilindros recomendados por la metodología oficial de la USP, así como con un adecuado instrumento de medición pues aunque en este caso se realizó dicho procedimiento con una regla milimétrica lo más conveniente es contar, como mínimo, con un vernier. Con la utilización de éstos dos instrumentos se daría indudablemente una mayor uniformidad en los resultados y se minimizarían los errores en las mediciones. También puede ser útil el colocador de cilindros aunque lo primordial son los anteriores.

Es significativo destacar que actualmente existen formas de automatización de este tipo de ensayos; por ejemplo mediante programas de cómputo e instrumentos en los que es posible medir los halos de inhibición y al mismo tiempo se realizan los cálculos respectivos. Pero indudablemente estos equipos tienen un costo muy elevado pues habría que importarlo y posiblemente se requiere de asesoría técnica para su uso; sin embargo podría considerarse como una alternativa cuando se tenga más clara la decisión de implementar o no las pruebas de potencia microbiológica de antibióticos.

Por otra parte, cabe destacar que si bien este ensayo no es muy complicado en cuanto a técnica una vez validada la metodología, sí requiere de muchísimo tiempo pues es una labor de cuidado principalmente para la preparación de las soluciones y las mediciones. Además por el volumen de pruebas que requiere la empresa lo más apropiado sería contratar a una persona que pueda dedicarse exclusivamente a este análisis, de esta manera, también es posible que adquiriera más práctica y mejore constantemente la forma de manipulación y se capacite adecuadamente.

A pesar de que el principal objetivo de este trabajo era evaluar la factibilidad de implementación de la prueba de biopotencia en el Laboratorio de Control de Calidad, los resultados obtenidos no fueron del todo satisfactorios para aprobar su implementación, por lo que se recomienda extender el estudio por más tiempo y

ahondar en la metodología para hacer el análisis más exhaustivo, con mayor cantidad de productos y más repeticiones que permitan, además, aplicar análisis estadísticos que prueben más a fondo la viabilidad en los resultados y permitan a la empresa tener bases sólidas con respecto a sus reportes, de manera que los resultados sean más certeros y confiables.

También es indispensable, como en el resto de las actividades de la industria farmacéutica, que se logre validar este proceso, para lo cual deben probarse al menos tres lotes de producto en cada caso. Esto permitiría comprobar que la metodología empleada es aplicable en esos productos bajo esas condiciones.

En el caso de la prueba con gentamicina no se tuvieron resultados concluyentes pese a las variaciones que se realizaron al método luego de aplicarlo la primera vez, por eso es imprescindible profundizar en este ensayo y jugar con otros factores como concentración de los estándares y la muestra, cantidad de inóculo, estandarización de la solución de inóculo, temperatura o tiempo de incubación para determinar la verdadera razón de la falla que se generó en este estudio.

Por el momento y por la condición del laboratorio lo más conveniente, pese a la rápida obtención de resultados y a la fácil recuperación de la inversión inicial derivada de implementación de la prueba, es seguir contratando los servicios de laboratorios externos hasta que se logre mejorar todos los aspectos antes mencionados.

IX. LITERATURA CITADA

- BALLESTÉ, R; ARTETA, Z; BARLOCO, A; MIER, C; FERNÁNDEZ, N; MOUSQUÉS, N; XAVIER, B; CABRERA, M; COMBOL, A Y GEZUELE, E. 2006. **Evaluación del Desempeño diagnóstico del Medio de Difusión en Agar Etest para el Estudio de Sensibilidad a los Antifúngicos.** Revista Médica del Uruguay 2006, vol. 22, 128-135 p. <<http://www.rmu.org.uy/revista/2006v2/art7.pdf>>
- BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). Volume IV. 2007. Appendix XIV A. **Biological Assay of Antibiotics.**
- CAMACHO, A Y ARIAS, J. 2002. **Implementación y estandarización de la técnica para la determinación de potencia microbiológica de neomicina en crema tópica fabricada en una planta productora de medicamentos.** Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
<<http://www.javeriana.edu.co/ciencias/universitas/vol8n1/JARIAS.htm>>
- FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE COSTA RICA (UCR). 2004. **Bioensayos Aplicados a Medicamentos.** Curso de Microbiología para Farmacia. 90 p.
- FERNÁNDEZ, M; MUÑOZ, G; PALAZÓN, Z; GUTIÉRREZ, M; CARRILLO, D Y BILBAO, O. 2006. **Estudio de la Actividad Antimicrobiana de la Combinación Qutina-Gentamicina.** Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Oct.-Dic. 2006. Vol. 37, no. 04. 21-29 p.
- GARCÍA, C; PARDO, J Y SEAS, C. 2003. **Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso.** Revista Médica Herediana. Octubre 2003. Vol. 14, no. 4. 221-223 p.

- GENNARO, A. 2000. **Remington. The Science and Practice of Pharmacy.** 20^a Edición. Philadelphia, USA. 547-548 p.
- GERÓNIMO, M; MATEOS, F; BLANCH, J Y MARTÍNEZ, E. 2002. **Antibióticos aminoglucósidos. Origen, estructuras y propiedades físico-químicas.** Revista Medicine, Doyma. 2002. Vol. 08, No. 65 p. 3470 – 3480.
- HERRERA, M; HERRERA, M; VARGAS, A; MOYA, T Y YOCK, I. 2000. **Sensibilidad antimicrobiana de 4015 cepas de Staphylococcus sp. 1995-2000.** Revista Médica Hospital Nacional de Niños (Costa Rica). 2001. Vol. 36, no. 1-2. 15-29 p.
- ITURBURU, I; EMPARAN, C; APECECHEA, A; EZPELETA, C; GÓMEZ, A Y MÉNDEZ, J. 2000. **Modificaciones de los gérmenes aerobios y su sensibilidad en relación con el uso de los antibióticos.** Revista Cirugía Española, Doyma. 2000. Vol. 67, no. 2. 138-144 p.
- JAWETZ, E; MELNIK, J Y ADELBERG, E. 1988. **Microbiología Médica.** Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. 12^a Edición. México D.F. 636pp.
- JIMÉNEZ, M Y ESTIVAL, M. 1995. **Estudio de la estabilidad microbiológica de la ampicilina trihidratada suspensión oral de 125 mg.** *Revistas Médicas Cubanas. Sintefarma Revista electrónica.* Junio 1995, vol. 1, no. 2.
- JURADO, R; CANTERO, P; RIVERO, A Y KINDELÁN, J. **Infecciones por estafilococos.** 2002. Revista Medicine, Doyma. Febrero 2002. Vol. 08, no. 62. 3305-3308 p.
- LEIVA, A; MORALES, I; PACHCO, J; DEMIRANDA, J; ESQUIVEL, M Y ALVARADO, A. 2001. **Guía para la Realización de Estudios de Estabilidad de Medicamentos.** Comisión Nacional de Calidad de

Medicamentos. Subcomisión de Estabilidad de Medicamentos. Inf. 32, Costa Rica, Octubre 2001.

LODE, H Y STAHLMANN, R. 2004. *Staphylococcus epidermidis*. Revista Antibioticoterapia. 2004. Vol. 2, no. 1.

MARTÍNEZ, M; LÓPEZ, M; RODRÍGUEZ, Z Y RUBALCABA, Y. 2000. **Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal)**. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2000. Vol. 5, no. 1.

MASCARETTI, O. 2003. **Bacteria versus Antibacterial Agents. An integrated approach**. Editorial ASM Press. Washington, D.C., USA. 393 pp.

MATEOS, P. 2006. **Tema 15: Producción de Antibióticos**.
<http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema15MI.html>

MÉNDEZ, P; DIAZ, J; SILVA, E; GONZÁLEZ, P; MORENO, E; AMAYA, P; SERRATO, N Y SÁENZ, E. 2005. **Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos *in vitro***. Revista Colombiana de Ciencia, Química y Farmacia. 2005. Vol. 34, no. 2.

MONTIEL, F. 1997. **Flora Bacteriana Natural**. Boletín Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Pontificia Universidad Católica de Chile. 1997. Vol. 23, no. 6.

MORALES, J. Y VELAZCO, C. **Curvas standard y determinación de potencia antibiótica**. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. Dic. 1957, vol.11, no.1-2. 92-103 p.

- MORENO, M Y RUIZ, E. 2007. ***Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefaroconjuntivitis.** Revista Médica Hospital General de México. 2007. Vol. 70, no. 1. 24-29 p.
- MUÑOZ, G; VALDÉS, J Y LEONARD, V. 1997. **Estabilidad acelerada de Polimixina B colirio en solución acuosa y liofilizado por método de evaluación microbiológica.** *Revistas Médicas Cubanas. Sintefarma Revista electrónica.* Junio 1997, vol. 3, no. 1.
- OBREGÓN, G Y ZAVALA, A. 2000. **Control de calidad de Discos de Sensibilidad Antibiótica Comercializados en el Mercado Peruano.** Revista Medicina Experimental. 2000. Vol. 17, no. 1-4.
- PÉREZ, D; DUANY, C Y CARMONA, C. 1998. **Estudio de la Gentamicina Crema 0,1% producida en Cuba.** *Revistas Médicas Cubanas. Sintefarma Revista electrónica.* Diciembre 1998, vol. 4, no. 2.
- QUEVEDO, F. 2004. **El control de la calidad integral de los medicamentos.** Revista Diagnóstico. 2004. Vol. 43, no. 2.
- SCRAGA, A. 2000. **Biología para Ingenieros. Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos.** Traducción: Leonor Huerta. Editorial LIMUSA. México, D.F. México. 349-361 p.
- U. S. PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP XXVII). 2004. **Biological Tests and Assays. Antibiotics-Microbial Assays.** 2163-2169 p.
- U. S. PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP XXX). 2007. **Biological Tests and Assays. Antibiotics-Microbial Assays.**

X. ANEXOS

Anexo 1. Metodología Oficial USP

A continuación se detalla la metodología propuesta por la USP XXX (U. S. Pharmacopeia, 2007) para determinar la potencia de gentamicina y neomicina sulfato en producto terminado. Es importante también señalar que este procedimiento establece la aplicación del método cilindro-placa en ambos casos y solo para neomicina es posible utilizar el método turbidimétrico.

Receptáculos del Ensayo Cilindro-Placa

En este método se utilizan placas de vidrio o plástico con dimensiones de aproximadamente 20 x 100 mm y cilindros de porcelana o acero inoxidable con 8 mm de diámetro externo, 6 de diámetro interno y 10 mm de altura. Estos instrumentos deben ser lavados cuidadosamente para eliminar todos los residuos.

Receptáculos del Ensayo Turbidimétrico

Para la prueba en tubo se usan tubos de ensayo de vidrio o plástico que sean uniformes en cuanto a longitud, diámetro y grosor; además que no presenten manchas o rayones en la superficie. Se deben lavar muy bien para remover todos los residuos de antibiótico y trazas de la solución limpiadora y esterilizar antes de su uso.

Medios

Para la preparación del microorganismo de prueba, tanto en el caso de *Klebsiella pneumoniae* como de *Staphylococcus epidermidis*, se requiere el Medio Antibiótico 1:

Peptona.....6.0 g
 Caseína pancreática digerida.....4.0 g
 Extracto de levadura.....3.0 g
 Extracto de carne.....1.5 g
 Dextrosa.....1.0 g
 Agar.....15.0 g
 Agua.....1000.0 ml
 pH después de esterilización 6.6±0.1

El inóculo se debe preparar para *S. epidermidis* con Medio Antibiótico 11 que tiene la misma composición del anterior pero con un pH después de esterilizar de 8.3±0.1. En el caso de *K. pneumoniae* se sugiere utilizar el medio antibiótico 5, con la siguiente composición:

Peptona.....6.0 g
 Extracto de levadura.....3.0 g
 Extracto de carne.....1.5 g
 Agar.....15.0 g
 Agua..... 1000.0 ml
 pH después de esterilización 7.9±0.1

Buffer Fosfato

Para estos antibióticos bajo análisis se requiere el buffer No. 3 durante la preparación de la muestra y los estándares de antibiótico. Para obtener el buffer No. 3, 0.1 M, pH 8.0 se disuelven 16.73 g de fosfato de potasio dibásico y 0.523 g de fosfato de potasio monobásico en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N según sea necesario. El valor especificado corresponde a pH después de esterilizar la solución.

Preparación del Estándar

Para preparar una solución madre, se disuelve una cantidad del estándar de referencia del antibiótico en el buffer No. 3, después se diluye para lograr una concentración final de 1 mg/ml en el caso de la solución para la prueba de Cilindro-Placa y en el método turbidimétrico para neomicina dicha concentración debe corresponder a 100 µg/ml. El patrón de neomicina puede almacenarse en refrigeración luego de su preparación y ser utilizado durante un periodo de 14 días y para la gentamicina este periodo de almacenamiento puede extenderse hasta los 30 días.

El día del ensayo se preparan, a partir de la solución, madre cinco o más diluciones de prueba con un incremento gradual y sucesivo de la concentración manteniendo dentro de la serie la concentración media especificada, que para gentamicina es de 0.1 µg/ml y para neomicina 1 µg/ml.

Preparación de la Muestra

El día del ensayo se elabora una solución madre y una dilución de prueba para la muestra en análisis con el mismo diluyente que el utilizado para los estándares de referencia. Las pruebas con cinco niveles del estándar requieren solamente un nivel de la incógnita a una concentración equivalente al nivel medio del estándar (0.1 µg/ml ó 1 µg/ml según se indica para cada antibiótico).

ORGANISMOS E INÓCULO

Organismo de Prueba

El microorganismo utilizado en el método Cilindro-Placa tanto para gentamicina como neomicina corresponde a *Staphylococcus epidermidis*, que tiene el número de identificación ATCC (*American Type Culture Collection*) 12228 y el método turbidimétrico para neomicina emplea la especie *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

Preparación del inóculo

Previo al ensayo debe removerse el crecimiento de un cultivo del microorganismo en tubo de ensayo con 3 ml de solución salina estéril, con esta suspensión se inocula la superficie de 250 ml del medio antibiótico 1 solidificado en una botella Roux y se incuba por aproximadamente 24 horas a 36.0 – 37.5 °C para *K pneumoniae* y el mismo periodo a 32 – 35 °C para *S. epidermidis*.

Transcurrido el tiempo de incubación se colecta el crecimiento en la superficie del agar y se coloca en 50 ml de solución salina para crear una suspensión stock del microorganismo. De esta preparación se deben colocar 2 ml por cada 100 ml de medio cuando se trata de *K. pneumoniae* para la prueba turbidimétrica de neomicina y 0.03 ml o 0.4 ml de *S. epidermidis* para la prueba con gentamicina y neomicina respectivamente.

En el método turbidimétrico, luego del periodo de incubación, los tubos que contienen la dosis media del estándar deben presentar una absorbancia de al menos 0.3 unidades de absorbancia.

En el caso de la prueba por Cilindro-Placa, se debe verificar la adecuada cantidad de microorganismo en el inóculo mediante los resultados de una demarcación satisfactoria de zonas de inhibición que tengan entre 14 y 16 mm de diámetro.

El inóculo debe ser preparado en medio antibiótico 11 que fue esterilizado y enfriado hasta los 45 – 50°C. Luego se agita para obtener una suspensión homogénea.

PROCEDIMIENTO

Diseño de Análisis

En este tipo de bioensayos se tiene una variable precisión debido a la segregación de muchas fuentes potenciales de error y la posibilidad de diversos diseños

experimentales adecuados. En un ensayo Cilindro-Placa, las principales comparaciones se restringen a las relaciones entre la medida del diámetro de las zonas de inhibición. Para conducir un ensayo turbidimétrico que refleje las diferencias en la concentración de antibiótico se requiere una gran uniformidad en el ambiente respecto a un estricto control termostático. Por la tanto, las comparaciones principales se restringen a las relaciones entre las turbiedades en las series de tubos.

Es conveniente diseñar un ensayo con un set de tratamientos con no menos de tres tubos para cada muestra y cada concentración estándar. Se recomienda un ensayo de un nivel con una curva estándar. Preparar soluciones de 5, 6 o más diluciones de prueba, procurando que incluyan la concentración de referencia para el estándar. Se considera una prueba como preliminar si la potencia medida es menos de 80% o más de 125% de la asumida en la preparación de la solución stock de la incógnita. En este caso, se ajusta la potencia asumida y se repite la prueba.

Las determinaciones microbiológicas de potencia están sujetas tanto a las variables inter como intraensayo, por eso se requiere de dos o más análisis independientes para una estimación real de la potencia. El resultado combinado de una serie de pequeños análisis independientes distribuidos en varios días ofrece una estimación de potencia más certera que un único ensayo largo con el mismo número de placas o tubos.

Método Cilindro-Placa

Para preparar las placas se colocan 21 ml de Medio 11 y se agregan 4 ml del Medio 11 inoculado, de manera que quede disperso en toda la superficie y se deja solidificar. Se dejan caer seis cilindros desde una altura de 12 mm sobre el agar inoculado utilizando una guía mecánica u otro dispositivo para asegurar su espaciado en un rango de 2.8 cm. Se tapan las placas para evitar contaminación.

Después de llenar los seis cilindros con las diluciones de antibiótico, que contienen los niveles de prueba que se mencionan adelante, se incuban las placas a 36 – 37.5 °C.

Para el ensayo de un nivel con una curva estándar, se preparan diluciones representativas para cinco niveles de prueba del estándar (SE_1 a SE_5) y un solo nivel de prueba para la incógnita o muestra, U_3 , correspondiente a SE_3 de la curva estándar según se describe en los apartados de Preparación del Estándar y Preparación de la Muestra. Para obtener la curva estándar, se llenan cilindros alternos con la dilución media de prueba (SE_3) en las tres placas y los restantes nueve cilindros con una de las otras cuatro diluciones del estándar. Para cada incógnita, se llenan de igual forma cilindros alternos con la solución media del estándar y en los restantes nueve cilindros colocar la dilución de prueba de las muestra.

Método Turbidimétrico

El día del análisis se preparan las cantidades necesarias por dilución de las soluciones stock del estándar y de cada muestra. Agregar 1.0 ml de cada dosis en cada uno de los tubos de ensayo preparados y se colocan los tres tubos replicados en una posición al azar en una gradilla. Se incluye en cada serie uno o dos tubos control con el diluyente de prueba pero sin antibiótico, que en este caso corresponde al Buffer No. 3. Posteriormente adicionar 9.0 ml de inóculo en cada uno de los tubos de la serie en turno y colocar inmediatamente la gradilla en una incubadora o baño de agua a 36 – 37.5 °C. Se incuba de 4 a 5 horas. Transcurrido este periodo se coloca 0.5 ml de formaldehído diluido en cada tubo y se lee su transmitancia o absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 – 580 nm.

Al igual que el método anterior en este se deben preparar cinco niveles de prueba del estándar y un nivel para la incógnita correspondiente a la dosis media del estándar. Para determinar el tiempo exacto de incubación se observa el crecimiento en la concentración de referencia (dosis media) de las diluciones del estándar.

Cálculo de Potencia

Para calcular la potencia a partir de los datos obtenidos tanto por el método turbidimétrico o por el Cilindro-Placa se procede por interpolación de potencias de una curva estándar, usando transformación logarítmica, método de línea recta con un adecuado procedimiento de mínimos cuadrados y una prueba de linealidad. Donde varios ensayos del mismo material se realizan con la misma curva estándar, calcular el coeficiente de variación de los resultados de todos los ensayos. Donde más de un ensayo es hecho del mismo material con diferentes curvas estándar, se promedian los dos o más valores de potencia.

Anexo 2. Composición del Medio de Cultivo Agar Nutritivo (Oxoid)

Extracto de carne.....	1.0 g/L
Extracto de levadura.....	2.0 g/L
Peptona.....	5.0 g/L
Cloruro de sodio.....	5.0 g/L
Agar.....	15.0 g/L

Anexo 3. Composición del Medio de Cultivo Agar Tripticasa Soya (Oxoid)

Triptona.....	15.0 g/L
Soya peptona.....	5.0 g/L
Cloruro de sodio.....	5.0 g/L
Agar.....	15.0 g/L

Anexo 4. Detalle de los valores obtenidos en la medición de los halos de inhibición en la prueba con Otosedán.

	SE1		SE2		SE4		SE5	
	a	c 1-9	b	c 10-18	d	c 19-27	e	c 28-36
Placa 1	11,5000	14,8300	14,8300	15,5000	18,6700	17,6700	23,0000	21,0000
	-	-	13,3300	13,6700	-	-	-	-
	11,3300	14,5000	14,6700	14,8300	16,8300	15,1700	-	-
Placa 2	10,5000	14,6700	14,6700	15,5000	-	-	-	-
	12,6700	14,3300	12,8300	14,0000	18,6700	15,6700	-	-
	12,3300	13,3300	11,6700	14,5000	14,5000	14,3300	-	-
Placa 3	11,0000	14,0000	10,8300	14,5000	18,5000	18,5000	-	-
	12,6700	14,3300	14,6700	14,6700	16,6700	16,5000	-	-
	13,5000	16,6700	14,3300	14,3300	16,6700	16,3300	-	-
Promedio	11,9375	14,5825	13,5367	14,6111	17,2157	16,3100	23,0000	21,0000
Corrección	13,9809		15,5515		17,5316		18,6259	
Promedio c 1-36	16,6259							

	M1 (L:22026)		M2 (L:44077)	
	M1	c 1-9	M2	C 9-18
Placa 1	16,6700	17,6700	20,6700	17,7000
	15,8300	15,3300	19,1700	15,8300
	17,8300	15,5000	19,8300	15,6700
Placa 2	18,6700	15,0000	19,1700	18,6700
	18,0000	16,3300	19,8300	16,0000
	19,0000	17,0000	19,0000	16,3300
Placa 3	15,8300	14,6700	-	-
	17,3300	16,5000	-	-
	17,3300	16,8300	-	-
Promedio	17,3878	16,0922	19,6117	16,7000
Corrección	17,6917		19,3078	
Promedio c 1-27	16,3961			

Anexo 5. Detalle de los valores obtenidos en la medición de los halos de inhibición en la prueba con Gatropectán.

	SE1		SE2		SE4		SE5	
	a	c 1-9	b	c 10-18	d	c 19-27	e	c 28-36
Placa 1	10,0000	13,3300	-	-	14,5000	13,8300	14,5000	13,5000
	11,3300	13,0000	14,0000	15,3300	-	-	13,7500	13,5000
	11,6700	15,3300	-	-	-	-	13,7500	11,5000
Placa 2	11,5000	15,5000	13,1700	14,5000	14,5000	14,0000	14,5000	10,0000
	12,3300	15,3300	-	-	-	-	13,7500	13,5000
	10,0000	14,3300	-	-	14,0000	14,0000	14,5000	13,2500
Placa 3	13,1700	13,3300	-	-	14,0000	13,5000	13,5000	13,0000
	8,1700	13,1700	12,1700	13,5000	16,0000	14,5000	14,7500	14,0000
	10,3300	14,1700	-	-	14,7500	14,0000	14,0000	13,5000
Promedio	10,9444	14,1656	13,1133	14,4433	14,6250	13,9717	14,1111	12,8611
Corrección	10,6393		12,5304		14,5138		15,1104	
Promedio c 1-36	13,8604							

	M1 (L:06047)	
	M1	c 1-9
Placa 1	14,5000	14,5000
	15,0000	14,0000
	15,5000	15,0000
Placa 2	15,7500	13,0000
	14,5000	13,5000
	15,0000	13,0000
Placa 3	15,0000	14,0000
	14,0000	13,3300
	13,7500	13,5000
Promedio	14,7778	13,7589
Corrección	14,7778	
Promedio c 1-27	13,7589	

Anexo 6. Detalle de los valores obtenidos en la medición de los halos de inhibición en la prueba con Calox-Dry.

	SE1		SE2		SE4		SE5	
	a	c 1-9	b	c 10-18	d	c 19-27	e	c 28-36
Placa 1	15,8300	16,0000	14,5000	16,3300	18,3300	18,0000	20,0000	19,2500
	15,5000	15,6700	14,5000	16,8300	18,1700	17,3300	19,6700	17,5000
	15,3300	18,5000	15,0000	16,7500	19,0000	18,0000	20,6700	18,5000
Placa 2	16,0000	19,0000	19,0000	19,0000	18,8300	17,5000	20,5000	18,2500
	16,8300	19,8300	-	-	19,0000	18,2500	20,3300	19,5000
	15,5000	19,0000	-	-	19,1700	19,0000	20,0000	19,0000
Placa 3	17,2500	19,3300	18,2500	19,0000	19,0000	17,8300	19,8300	19,0000
	15,5000	19,5000	17,7500	18,5000	18,6700	17,2500	21,5000	18,6700
	-	-	-	-	19,3300	18,3300	20,8300	20,0000
Promedio	15,9675	18,3538	16,5000	17,7350	18,8333	17,9433	20,3700	18,8522
Corrección	15,8348		16,9861		19,1111		19,7389	
Promedio c 1-36	18,2211							

	M1 (L:16116)	
	M1	c 1-9
Placa 1	24,5000	19,3300
	24,0000	17,6700
	24,6700	17,5000
Placa 2	26,5000	18,5000
	26,0000	17,0000
	26,8300	19,0000
Placa 3	25,3300	17,0000
	25,7500	19,0000
	25,1700	19,0000
Promedio	25,4167	18,2222
Corrección	25,4167	
Promedio c 1-27	18,2222	

HOJA DE INFORMACIÓN

Información del estudiante:

Nombre: José David Mora Meza

Cédula: 3 0414 0312

Carné ITCR: 200424286

Dirección de su residencia en época lectiva: San Rafael de Oreamuno, Cartago

Dirección de su residencia en época no lectiva: San Rafael de Oreamuno, Cartago

Teléfono en época lectiva: 842-7726 / 552-6332

Teléfono época no lectiva: 842-7726 / 552-6332

Email: davidmm242004@yahoo.com

Información del Proyecto:

Nombre del Proyecto: Implementación y Desarrollo de la Técnica de Potencia
Microbiológica de Antibióticos y su Impacto Económico en la
Empresa Calox de Costa Rica, S.A.

Profesor Asesor: Ing. Olga Rivas Solano

Horario de trabajo del estudiante: L – V: 7:30 am – 4:30 pm

Información de la Empresa:

Nombre: Calox de Costa Rica, S.A.

Zona: Área Metropolitana

Dirección: 100 m Sur de Tostadora La Meseta, Calle Blancos de Guadalupe, San José

Teléfono: 248-0506

Fax: 248-0506

Actividad Principal: Industria Farmacéutica (producción de medicamentos de uso humano y veterinario).